

Aus der Augenklinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Anselm Kampik

**Immunhistochemisches Verteilungsmuster von Komponenten der
Basalmembranzzone in gesunder Bindehaut, Bindehaut bei
Glaukom und normaler Haut**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Veronique Marguerite-Marie Valet

aus

München

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Anselm Kampik

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Jörg Christoph Prinz
Prof. Dr. med. Mehdi Shakibaei

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: PD Dr. med. Elisabeth Meßmer

Dekan: Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 17.07.2008

Abkürzungen

AG	Antigen
AK	Antikörper
APAAP	alkalische Phosphatase-antialkalische Phosphatase
AT	Augentropfen
BH	Bindehaut
BM	Basalmembran
BMZ	Basalmembranzone
CAH	Carboanhydrasehemmer
CWBG	chronisches Winkelblockglaukom
DICC	engl. drug-induced cicatricial pemphigoid (dt. Pseudopemphigoid)
EGF	epidermal growth factor
engl.	englisch
FCS	fötales Kälberserum
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HSPG	Heparan-Sulfat-Proteoglykan
IOD	intraokularer Druck
kD	Kilodalton
m	männlich
Min.	Minuten
MMP	engl. mucous membrane pemphigoid (dt. Schleimhautpemphigoid)
PAS	Perjodsäure-Schiff-Reagenz
POWG	primär chronisches Offenwinkelglaukom
PEX	Pseudoexfoliation
PGD	Prostaglandinderivat
v. a.	vor allem
vgl.	vergleiche
w	weiblich

1.	Einleitung	1
1.1.	Basalmembranen	1
1.1.1.	Aufbau, Struktur, Funktion und Pathologie	1
1.1.2.	Basalmembrankomponenten	7
1.1.2.1.	Kollagene	7
1.1.2.2.	Laminine	10
1.1.2.3.	Integrine	13
1.2.	Haut	15
1.2.1.	Aufbau der Haut	15
1.2.2.	Basalmembran der Haut	16
1.3.	Bindehaut	16
1.3.1.	Aufbau der Bindehaut	16
1.3.2.	Basalmembran der Bindehaut	17
1.4.	Blasenbildende Autoimmundermatosen	18
1.4.1.	Schleimhautpemphigoid	18
1.4.2.	Pseudopemphigoid	23
1.5.	Glaukom	23
1.5.1.	Primär chronisches Offenwinkelglaukom	25
1.5.2.	Sekundäres Offenwinkelglaukom	26
1.5.2.1.	Pseudoexfoliationsglaukom (PEX-Glaukom)	26
1.5.2.2.	Pigmentdispersionsglaukom	27
1.5.2.3.	Kortisonglaukom	27
1.5.2.4.	Glaukom durch Entzündungen/Verletzungen	27
1.5.3.	Primäres Winkelblockglaukom	27
1.5.4.	Sekundäres Winkelblockglaukom	28
1.5.4.1.	Neovaskularisationsglaukom	28
1.5.4.2.	Posttraumatisches Glaukom	28
1.5.5.	Kongenitales Glaukom	28
2.	Ziele der Arbeit	29
3.	Material und Methoden	30

3.1.	Patientengut	30
3.2.	Antikörper	33
3.3.	Immunhistochemie	34
3.3.1.	Gewebevorbereitung	34
3.3.2.	Anfertigen von Gefrierschnitten	34
3.3.3.	Fixierung.....	34
3.3.4.	Alkalische Phosphatase-antialkalische Phosphatase (APAAP)- Methode.....	35
3.3.5.	Gegenfärbung und Einbettung.....	36
3.3.6.	Färbekontrollen.....	36
3.3.7.	Vergleichbarkeit der Präparate	37
3.4.	Auswertung und Dokumentation der Ergebnisse	37
3.5.	Statistik	37
4.	Ergebnisse.....	38
4.1.	Gesunde Bindehaut.....	38
4.2.	Bindehaut bei Glaukom	41
4.3.	Lidhaut.....	44
4.4.	Unterschiede zwischen gesunder Bindehaut und Bindehaut bei Glaukom	46
4.5.	Unterschiede zwischen Binde- und Lidhaut	48
5.	Diskussion	50
5.1.	Immunhistochemische Untersuchung der Basalmembranen	50
5.2.	Assoziation von Glaukom und Schleimhautpemphigoid.....	54
6.	Zusammenfassung	58

7.	Literaturverzeichnis	60
8.	Anhang	74
8.1.	Färbeprotokoll APAAP-Methode	74
8.2.	Reagenzien	74
8.2.1.	Antikörper-Verdünnungsreagenzien	74
8.2.2.	APAAP	75
8.2.3.	Farbstoff-Substrat	75
8.2.4.	1%iges FCS	75
8.2.5.	Tris-Puffer	75
9.	Danksagung	76
10.	Lebenslauf	77

1. Einleitung

1.1. Basalmembranen

1.1.1. Aufbau, Struktur, Funktion und Pathologie

Die Basalmembran (BM) ist eine aus extrazellulären Proteinen bestehende, schichtweise aufgebaute Struktur, die im Körper eine enge Verbindung zu Zellverbänden eingeht. Sie bildet eine Grenzfläche zwischen Epithel, Endothel, Gliazellverbänden und darunter liegendem Stroma und umgibt Axone peripherer Nerven, Muskel- und Fettzellen. Ihre Funktionen sind vielfältig: Sie stützt, verankert, kompartimentiert, sie ist am selektiven Stofftransport beteiligt, ist wichtig für die Ernährung und Differenzierung von Zellen und dient ihnen als Wachstumsschiene bei regenerativen Prozessen (Wundheilung). Gleichzeitig stellt sie eine Penetrationsbarriere für Zellmigration und gutartige Tumore dar [116].

Lichtmikroskopisch imponiert die Basalmembran als 20–300 nm breite, PAS positive, homogene, subzelluläre Einzelschicht (Abbildung 1-1). Elektronenmikroskopisch kann sie in drei Schichten eingeteilt werden (Abbildung 1-2) [86;90;126]:

1. Basallamina (Synonym: Lamina basalis), bestehend aus
 - 1.a der hellen Lamina lucida (Synonym: Lamina rara), mit einer Breite von 40–60 nm und
 - 1.b der elektronendichten Lamina densa (40–60 nm breit)
2. Lamina fibroreticularis (200–500 nm breit)

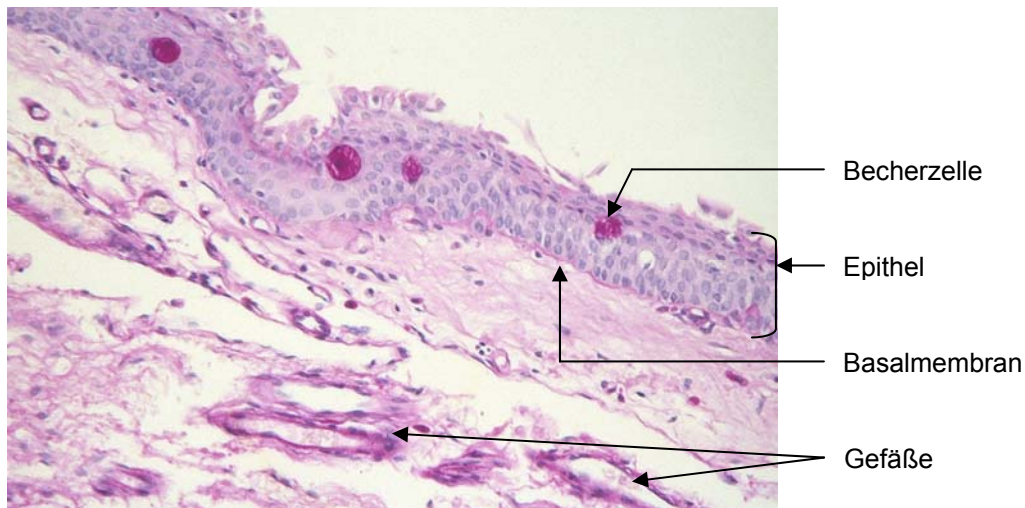


Abbildung 1-1: Bindehaut, PAS-Färbung, 20x

Das Mucin der Becherzellen und der hohe Glykoproteinanteil der Basalmembran bewirken eine PAS-positive Reaktion

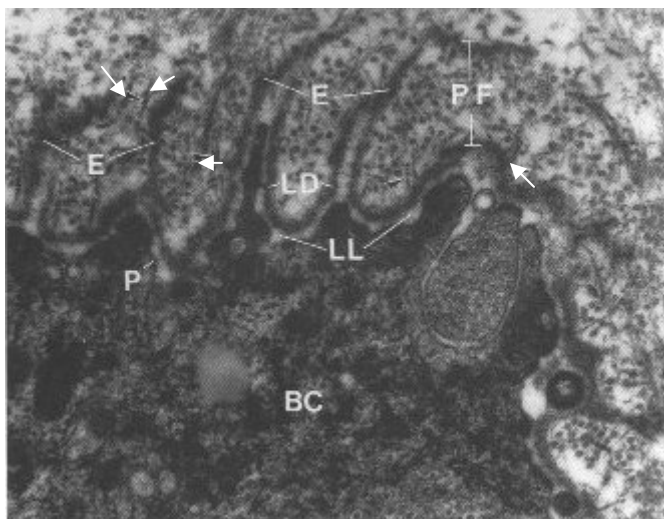


Abbildung 1-2: Elektronenmikroskopisches Bild der Basalmembran der Haut

BC = basale Epithelzelle, P = Plasmalemm (Zellmembran), LD = Lamina densa, LL = Lamina lucida, PF = Pars fibroreticularis, E = Ausläufer der Lamina densa, Pfeile = Verankerungsfibrillen (modifiziert nach <http://www.horseshoes.com/advice/anatomyandfunction/basementmembrane/basementmembrane.htm>)

Die Basalmembranen gegenüberliegender Zellen (meist Epithel und Endothel) können sich vereinigen, wenn darunter kein Bindegewebe vorhanden ist. In diesem Fall fehlt die Lamina fibroreticularis und die Laminae densae verschmelzen [1]. Die BM besteht dann aus:

1. Lamina lucida (rara) externa (an das Epithel grenzend)
2. Lamina densa
3. Lamina lucida (rara) interna (an das Endothel grenzend)

Die Fusion stellt eine geringere Diffusionsbarriere dar und ist bei der BM der Glomeruli (Blut-Harn-Schranke), der Linsenkapsel oder der Lungenalveolen (Blut-Luft-Schranke) zu finden.

Basalmembranen werden von einer Reihe unterschiedlicher Matrixproteine aufgebaut, deren Anzahl und Zusammensetzung von der Gewebeart, der Körperstelle, des Alters und des Geschlechts abhängig sind [15;16;24;31;34;45;49;82;113]. Bisher konnten ca. 50 [114] bis 100 [46] verschiedene Basalmembrankomponenten nachgewiesen werden, wobei jedoch nur wenige ubiquitär auftreten (Tabelle 1-1). Zu diesen zählen Kollagene (v. a. Typ IV), Glykoproteine (Laminin, Integrin, Fibronectin, Entaktin/Nidogen) und saure Proteoglykane (v. a. Heparan-Sulfat-Proteoglykane (HSPG) wie Perlekan) [32;115;117].

BM-Komponente	Lokalisation	Vorkommen
Kollagen I	Lamina fibroreticularis	ubiquitär
Kollagen III	Lamina fibroreticularis	ubiquitär
Kollagen IV	Lamina densa	ubiquitär
Laminin	Lamina lucida	ubiquitär
Integrin	Lamina lucida	ubiquitär
Fibronectin	Lamina lucida/fibroreticularis	ubiquitär
Entaktin = Nidogen	Lamina lucida	ubiquitär
HSPG (Perlekan)	Lamina lucida/densa	ubiquitär

Tabelle 1-1: Ubiquitär auftretende Basalmembrankomponenten

HSPG = Heparan-Sulfat-Proteoglykan; (modifiziert nach [82])

Einige Matrixproteine kommen nur in selektiven Geweben vor (Tabelle 1-2). Sie sind Bestandteile von spezialisierten Basalmembranen, die sich in ihrem Aufbau, der Dicke, den Laminin und Kollagen IV-Isoformen, den Proteoglykan-Gruppen und dem Vorhandensein akzessorischer Matrixproteine unterscheiden, von denen die meisten jedoch bisher nicht näher charakterisiert wurden [70;89].

BM-Komponente	Lokalisation	Vorkommen
Kollagen VII	Lamina densa	Epithelien
Kollagen XVII	Hemidesmosomen	Epithelien
Laminin-1 = EHS-Laminin	Lamina lucida	embryonales Epithel, Niere, Drüsen, Retina, Gehirn
Laminin-2 = Merosin	Lamina lucida	Skelett- und Herzmuskulatur, Aorta, Schwann'sche Zellen, Plazenta
Laminin-3 = S-Laminin	Lamina lucida	neuromuskuläre Synapsen, Glomeruli, Arterien
Laminin-4 = S-Merosin	Lamina lucida	Schwann'sche Zellen
Laminin-5 = Epiligrin = Kalinin = Nicein = BM600	Hemidesmosomen	Epithelien
Laminin-6 = K-Laminin	Lamina lucida	Epithelien
Laminin-7 = K-Laminin	Lamina lucida	Epithelien
Laminin-8	Lamina lucida	Endothelien
Laminin-10	Lamina lucida	Epithelien, Kapillaren, Venolen

Tabelle 1-2: Selektiv auftretende Basalmembrankomponenten

(modifiziert nach [15;16;24;31;45;49;82])

Die Bestandteile der Basallamina werden überwiegend von den Zellen gebildet, die ihr aufsitzen. In der Lamina lucida finden sich Laminine, Integrine, Fibronectin, Entaktin/Nidogen, Proteoglykane und Kollagen XVII (Abbildung 1-3). Die Lamina densa besteht größtenteils aus Kollagen IV und Proteoglykanen.

In der Lamina fibroreticularis können interstitielle Kollagentypen (v. a. Typ I und III) sowie Verankerungsplaques (Kollagen IV) und -fibrillen (Kollagen VII) nachgewiesen werden. Sie werden vorwiegend von Fibroblasten gebildet, mit Ausnahme von Kollagen VII, welches ausschließlich von Epithelzellen produziert wird.

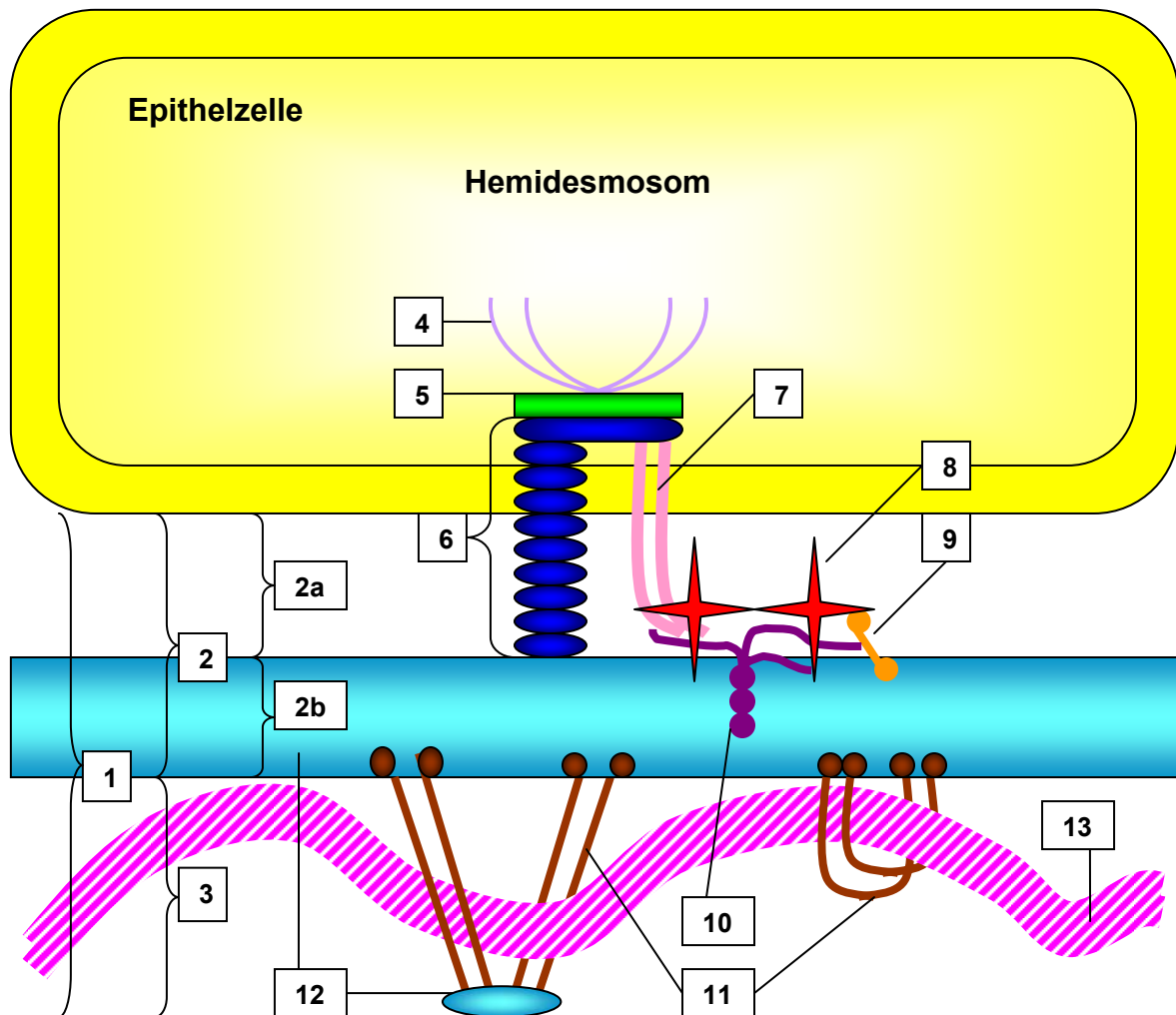


Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der Basalmembran von Epithelien

(modifiziert nach [70])

- | | | | |
|----|-------------------------------------|----|--|
| 1 | Basalmembran | 7 | Integrin |
| 2 | Basallamina | 8 | Laminin |
| 2a | Lamina lucida | 9 | Entaktin/Nidogen |
| 2b | Lamina densa | 10 | Perlekan |
| 3 | Lamina fibroreticularis | 11 | Verankerungsfibrillen aus Kollagen VII |
| 4 | Keratinfilamente | 12 | Kollagen IV |
| 5 | BP230 Protein-Plaue | 13 | Kollagen I, III |
| 6 | BP180 Protein-Plaue = Kollagen XVII | | |

Veränderungen der Basalmembranstruktur treten bei vielen verschiedenen Erkrankungen auf. Ihrer Ätiologie nach können sie in fünf Gruppen eingeteilt werden:

1. angeborene Erkrankungen
(z. B. Alport-Syndrom, Epidermolysis bullosa junctionalis)
2. metabolische Erkrankungen
(v. a. Diabetes mellitus)
3. Autoimmunerkrankungen
(z. B. Schleimhautpemphigoid, Goodpasture-Syndrom)
4. Infektionskrankheiten
(z. B. Chagas-Krankheit)
5. neoplastische Erkrankungen

Bei den Strukturveränderungen kann es sich um unspezifische Verdickungen der Basalmembran, wie beim Diabetes mellitus, oder um spezifische Veränderungen, wie Defekt oder Verlust einer Basalmembran Komponente, handeln. Sie führen zu krankhaften Veränderungen verschiedener Gewebe, wie Haut, Schleimhäute, Niere, Lunge und Gefäße. Ebenso wird das Metastasierungsverhalten von Tumoren beeinflusst [102].

1.1.2. Basalmembrankomponenten

1.1.2.1. Kollagene

Kollagene sind tripelhelikale Strukturproteine der extrazellulären Matrix. Sie machen 30% des gesamten Körperproteins aus. Kollagenfasern sind flexibel und äußerst zugfest. Aufgrund dieser Eigenschaften sind sie wichtiger Bestandteil von Binde-, Stützgewebe und Basalmembranen.

Derzeit sind 28 verschiedene Kollagentypen bekannt [53;121]. Sie werden unterteilt in interstitielle/fibrilläre (Typ I, II, III, V, XI), netzbildende (Typ IV, VIII, X), Fibrillen-assoziierte (Typ IX, XII, XIV, XV, XVI, XXII) mikrofibrilläre/perlenschnurartige (Typ VI) Kollagene, Verankerungsfibrillen (Typ VII) und Kollagene mit Transmembrandomänen (Typ XIII, XVII, XXIII, XXV). Basalmembran-assoziierte Kollagene sind Typ IV und VII.

Kollagen Typ IV ist der Hauptbestandteil der Lamina densa. Es liegt als Netzwerk in untereinander verbunden Di- und Tetrameren vor [127] (Abbildung 1-4.4). An dieses Gerüst binden zahlreiche Glykoproteine wie Laminin, Fibronectin, Entaktin/Nidogen, Proteoglykane und Kollagen VII. Die Haupt-Tripelhelix eines Monomers besteht aus drei α -Ketten, von denen bislang sechs Isoformen bekannt sind [78]. Die interponierte nicht helikale NC2-Domäne bewirkt ein hohes Maß an Flexibilität (Abbildung 1-4.1). Kollagen IV erfüllt wichtige Aufgaben der Basalmembran, wie die flexible Stabilisierung von dehnbaren Geweben (Gefäßwände), die Zellhaftung und die Bildung einer Permeabilitätsbarriere. Störungen dieser Funktionen treten bei genetischen Defekten und Autoimmunprozessen auf, wie beim Alport- und Goodpasture-Syndrom.

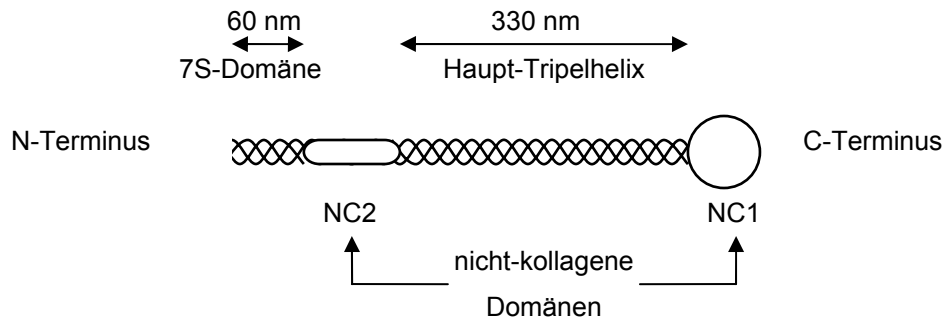


Abbildung 1-4.1: Kollagen IV-Monomer



Abbildung 1-4.2: Kollagen IV-Dimer

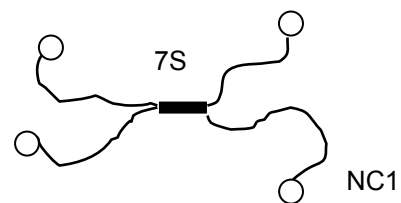


Abbildung 1-4.3: Kollagen IV-Tetramer

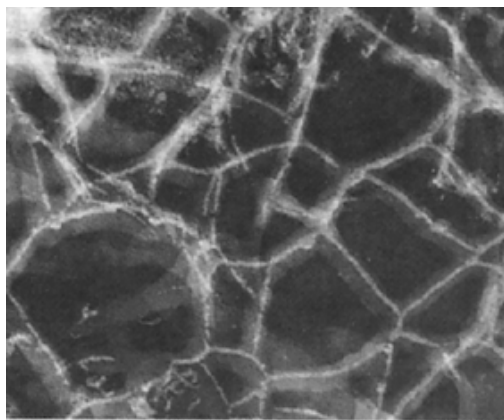


Abbildung 1-4.4: Kollagen IV-Netzwerk

Abbildung 1-4: Molekularer Aufbau von Kollagen IV

Abb 1-4.1: Monomer mit Haupt-Tripelhelix, NC1-, NC2- und 7S-Domäne. Dimere entstehen durch Kopf-an-Kopf-Lagerung der NC1-Domänen (Abb. 1-4.2), Tetramere durch Aneinanderlagerung der 7S-Domänen (Abb. 1-4.3; modifiziert nach [81;114]). Abb. 1-4.4: Elektronenmikroskopisches Bild des Kollagen IV Netzwerkes, das sich durch laterale Assoziation von Di- und Tetrameren bildet [127]

Kollagen Typ VII wird von spezifischen Epithelzellen gebildet, wie Plattenepithel, Urothel, Amnionepithel oder einigen Drüsenausführungsgängen [123]. Es ist als antiparalleles Dimer aufgebaut [68] (Abbildung 1-5.1). Durch laterale Assoziation bilden die Kollagen VII-Dimere Verankerungsfibrillen, welche an ihren beiden Enden je eine globuläre NC1 Domäne aufweisen [98] (Abbildung 1-5.2). Diese bindet an der Lamina densa oder an Verankerungsplaques des Stromas (Abbildung 1-3). Die Plaques sind auch untereinander durch Kollagen VII-Fibrillen verbunden und bilden in Interaktion mit den interstitiellen Kollagenfasern ein verwobenes Netzwerk.

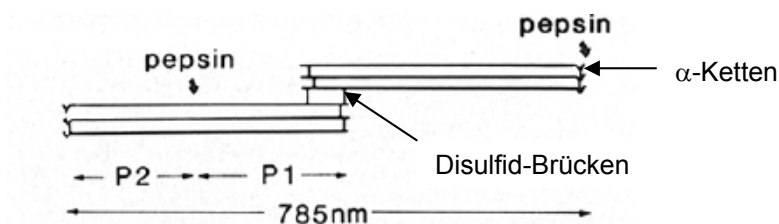


Abbildung 1-5.1: Kollagen VII-Dimer

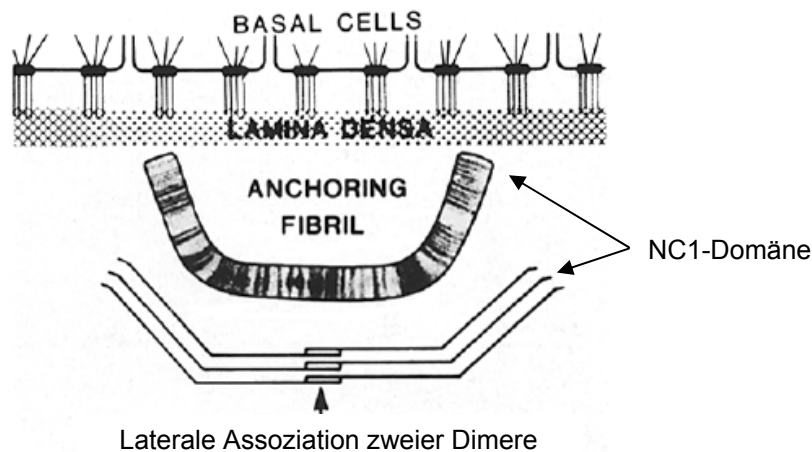


Abbildung 1-5.2: Verankerungsfibrille

Abbildung 1-5: Molekularer Aufbau von Kollagen VII

Abb. 1-5.1: Kollagen VII ist ein antiparalleles Dimer. Die Monomere bestehen aus drei helikalen α -Ketten, welche über Disulfid-Brücken miteinander verbunden sind. Abb. 1-5.2: Durch laterale Assoziation zweier Dimere entsteht eine Verankerungsfibrille, welche über ihre seitlichen NC1-Domänen an die Lamina densa gebunden ist (modifiziert nach [98])

Kollagen VII verankert die Basalmembran an das umgebende Stroma und bewirkt eine hohe mechanische Stabilität gegen Scherkräfte. Genetische Defekte des Kollagens oder Antikörper gegen die NC1-Domäne verursachen blasenbildende Hauterkrankungen wie die rezessive dystrophische Epidermolysis bullosa (RDEB) [71] oder die Epidermolysis bullosa aquisata [124]. Neuere Studien konnten nachweisen, dass die NC1-Domäne für die Ausbreitung von Hautkrebs bei RDEB-Patienten erforderlich ist [84].

1.1.2.2. Laminine

Laminin ist ein kreuzförmig aufgebautes Glykoprotein der extrazellulären Matrix [33;118]. Das heterotrimere Molekül besteht aus einer schweren α -Kette und zwei leichten Polypeptidketten, der β - und γ -Kette (neue Nomenklatur nach *Burgeson* [14], früher A-, B1- und B2-Kette [22]) (Abbildung 1-6.1).

Es gibt fünf verschiedene Formen der α -, drei der β - und drei der γ -Kette. Ihre Expression ist gewebeabhängig (Tabelle 1-3). Die Ketten können sich zu unterschiedlichen Laminin-Isoformen zusammenlagern, von denen bislang fünfzehn bekannt sind [21;32] (Abbildung 1-6.2).

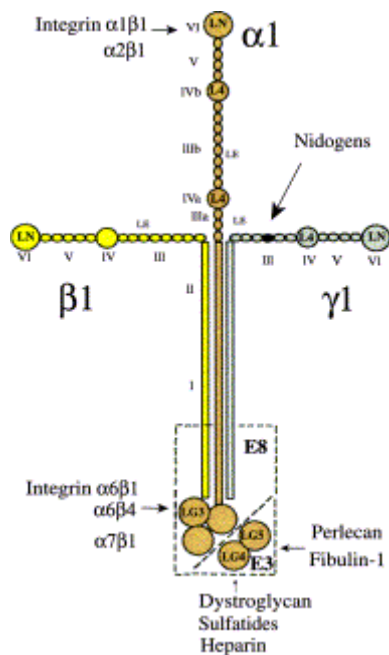


Abbildung 1-6.1: Laminin-1

Ketten			Isoform
α1	β1	γ1	Laminin-1
	β2	γ1	Laminin-3
α2	β1	γ1	Laminin-2
	β2	γ1	Laminin-4
	β1	γ3	Laminin-12
α3	β1	γ1	Laminin-6
	β2	γ1	Laminin-7
	β2	γ3	Laminin-13
	β3	γ2	Laminin-5
α4	β1	γ1	Laminin-8
	β2	γ1	Laminin-9
	β2	γ3	Laminin-14
α5	β1	γ1	Laminin-10
	β2	γ1	Laminin-11
	β2	γ3	Laminin-15

Abbildung 1-6.2: Laminin-Isoformen

Abbildung 1-6: Aufbau von Laminin und seiner Isoformen

Abb. 1-6.1: Schematische Darstellung von Laminin-1 mit Bindungsstellen für verschiedene Basalmembran- und Zelloberflächenkomponenten (Pfeile). Kreise = globuläre Domänen; kleine Kreise dazwischen = EGF-ähnliche Sequenzen; LN = Laminin N-Terminus; E8, E3 = Elastasefragment 8 und 3 (gestrichelte Linien). Abb. 1-6.2: Laminin-Isoformen mit spezifischer Kettenkombination (modifiziert nach [32])

Laminin-Kette	Gewebeexpression
α1	Epithelien im Entwicklungsstadium
α2	Skelett- und Herzmuskel, Aorta, periphere Nerven
α3	Haut und andere Epithelien
α4	Mesenchym
α5	nahezu ubiquitär
β1	nahezu ubiquitär
β2	neuromuskuläre Synapsen, Glomeruli
β3	Haut und andere Epithelien
γ1	nahezu ubiquitär
γ2	Haut und andere Epithelien
γ3	Haut, Herz, Oberfläche von Flimmerepithelien

Tabelle 1-3: Gewebeexpression der verschiedenen Laminin-Ketten

(modifiziert nach [21;24;32;56])

Die kurzen Arme des kreuzförmigen Moleküls bestehen aus je einem N-terminalen Kettenstück mit mehreren globulären Domänen. Sie zeigen in ihrer Aminosäuresequenz Ähnlichkeiten zum Aufbau des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF), was von funktioneller Bedeutung ist [33]. Der lange Arm wird von allen drei Ketten gebildet [33;101]. Das C-terminale Segment der α -Kette weist ein kugelförmiges Ende auf, das mit Hilfe des Enzyms Elastase weiter aufgespalten werden kann. Das Elastase-Fragment 3 (E3) bietet schwache Bindungsstellen für Zelloberflächenmoleküle (Dystroglykan, Sulfatide), Heparin und einige Basalmembrankomponenten (Kollagen IV, Perlekan, Fibulin-1) [29;54;85;99]. Hauptadhäsionsstelle für die meisten Zellen in vitro ist jedoch das Elastase-Fragment 8 (E8) [32]. Hieran binden spezielle Zellmembranrezeptoren, die Integrine (vgl. 1.1.2.3). Neben der Zelladhäsion und -polarisation konnte E8 für das Wachstum von Neuriten verantwortlich gemacht werden [27].

Laminin-Moleküle polymerisieren durch laterale Anlagerung und bilden so ein maschenartiges Netz in der Lamina lucida aus. Dieses Netz ist mit dem Kollagen IV-Netz der Lamina densa über Entaktin/Nidogen, Perlekan und anderen Proteinen verbunden (Abbildung 1-3). Kollagen IV kann auch direkt mit Laminin reagieren. Anlagerungspunkte finden sich hierzu an den kurzen Armsegmenten des Kreuzes und im Bereich des C-Terminus.

Laminin tritt früh in der Embryogenese auf und beeinflusst Wachstum, Differenzierung, Migration, Adhäsion und Polarisation von Zellen [21;55;65;69]. Als wichtigster, nicht-kollagener Bestandteil ist es ubiquitär in Basalmembranen zu finden, mit Ausnahme der Leber. Die Spezialisierung von Basalmembranen kommt unter anderem durch das selektive Auftreten bestimmter Laminin-Isoformen zustande (Tabelle 1-2). So ist Laminin-1 in fast allen epithelialen Organen des Embryos, aber nur in einigen reifen Geweben zu finden, wie der Niere, den meisten Drüsen, der Neuroretina und dem Gehirn. Laminin-2 (frühere Bezeichnung Merosin) ist in Schwann'schen Zellen, trophoblastären und muskulären Basalmembranen nachzuweisen [63], Laminin-3 (früher S-Laminin) in neuromuskulären Synapsen, perineuralen, arteriellen und glomerulären Basalmembranen [49]. Laminin-5 (Synonyme: Epiligrin, Kalinin, Nicein, BM600),

Laminin-6, -7 und -10 kommt in der Haut und anderen Epithelien vor [15;16;31]. Gefäße enthalten je nach Art und Größe Laminin-2,-3, -8 und -10 [24;45;49].

Genetische Defekte der Laminin-5-Ketten können zu blasenbildenden Haut- oder vernarbenden Schleimhauterkrankungen führen, wie der Epidermolysis bullosa junctionalis (Defekte in allen drei Ketten möglich) oder dem Laryngo-onycho-kutanen Syndrom (nur die $\alpha 3$ -Kette ist betroffen) [75]. Autoantikörper gegen Laminin-5 sind für das Schleimhautpemphigoid beschrieben worden [19;25;62].

1.1.2.3. Integrine

Integrine sind Transmembranproteine, die aus zwei Glykoproteinketten (α - und β -Kette) aufgebaut sind (Abbildung 1-7). Sie sind Bestandteile von Hemidesmosomen. Bisher sind 18 unterschiedliche α - und acht β -Ketten bekannt, die mindestens 24 verschiedene Integrine bilden können. Als Zelladhäsionsrezeptoren knüpfen sie Zellen an extrazelluläre Matrixproteine, wie Kollagen, Laminin, Fibronectin, Entaktin/Nidogen und Perlekan. Über intrazelluläre Adaptorproteine sind die Integrine mit dem Aktingerüst der Zelle verknüpft (Abbildung 1-3). So werden Signale der extrazellulären Matrix in die Zelle weitergeleitet, die Adhäsion, Polarität, Migration, Wachstum, Differenzierung und Überleben der Zellen regulieren [65;89]. Wesentliche Laminin-bindende Integrine sind $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$ und $\alpha 7\beta 1$, die fest an das E8-Fragment des Laminins anknüpfen [107]. Schwache Bindungen von $\alpha 1\beta 1$ - und $\alpha 2\beta 1$ -Integrinen sind auch am N-Terminus der Laminin- α -Kette möglich (Abbildung 1-6.1). Das Thrombozyten-Integrin GPIIb/IIIa bindet Fibrinogen und fördert so die Thrombozytenaggregation im Rahmen der Blutgerinnung [92].

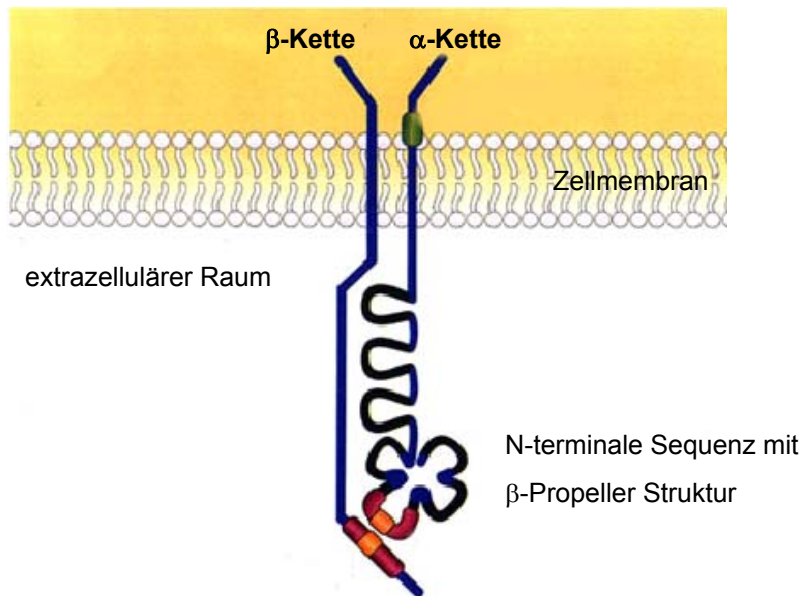


Abbildung 1-7: Schematischer Aufbau von Integrin

Integrine sind Transmembranproteine bestehend aus einer α - und β -Kette
(modifiziert nach http://bme.virginia.edu/ley/integrin_activation.html)

Veränderungen der Integrin-Expression, v. a. des $\alpha6\beta4$ -Integrins, können bei vielen soliden Tumoren nachgewiesen werden, wobei aberrante Integrin-Expressionsmuster häufig mit einer schlechten Prognose assoziiert sind [95]. Defekte des $\alpha6\beta4$ -Integrins verursachen eine mit Pylorusatresie assoziierte Form der Epidermolysis bullosa junctionalis. Autoantikörper gegen $\alpha6\beta4$ -Integrin werden als pathogentischer Faktor für das okuläre und orale Schleimhautpemphigoid diskutiert [9;10;20;96].

1.2. Haut

1.2.1. Aufbau der Haut

Die Haut (Cutis) besteht aus der Oberhaut (Epidermis) und der Lederhaut (Dermis/Corium). Die Epidermis ist ein mehrschichtig verhorntes Plattenepithel, welches in fünf Schichten unterteilt werden kann (Abbildung 1-8). Die unterste Schicht liegt der Basalmembran direkt auf und besteht aus mitotisch stark aktiven Basalzellen. Die Zellen der höheren Schichten verhornen und werden Keratinozyten genannt. Sie sind über spezielle Adhäsionsproteine, den Desmosomen, miteinander verbunden. Melanozyten sind pigmentbildende Zellen und in den unteren Epithelschichten zu finden.

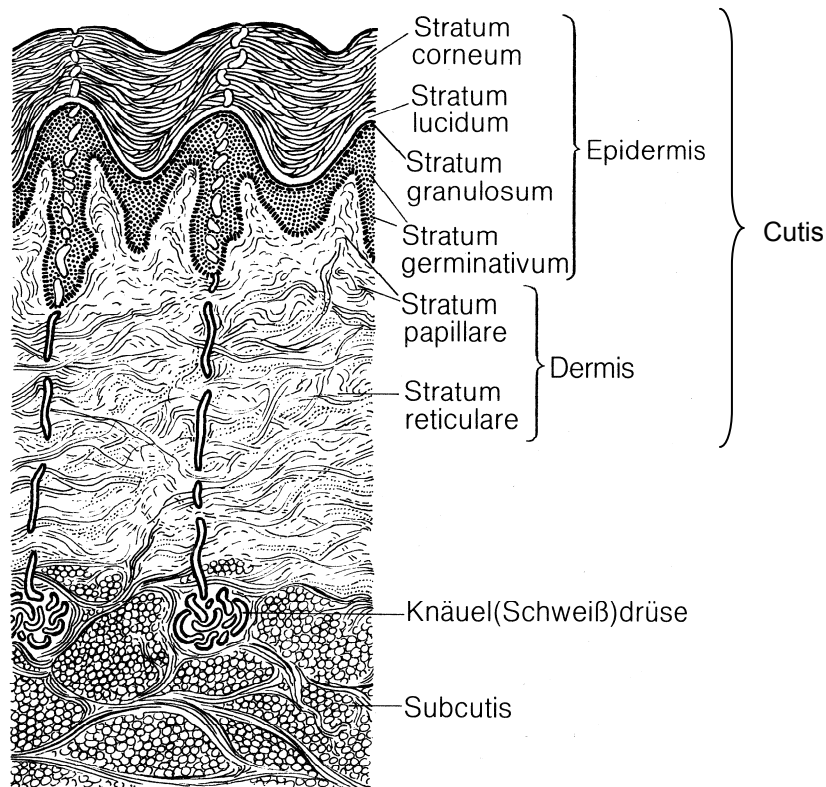


Abbildung 1-8: Schematischer Aufbau der Haut

Epidermis = Oberhaut, Dermis = Lederhaut, Cutis = Haut, Subcutis = Unterhaut; das Stratum germinativum besteht aus Stratum basale und Stratum spinosum (modifiziert nach [50])

1.2.2. Basalmembran der Haut

Die Basalmembran der Haut zählt zu den komplexesten Basalmembranen des menschlichen Körpers. Sie ist dreischichtig aufgebaut mit einer Lamina lucida, Lamina densa und Lamina fibroreticularis (Abbildung 1-2). Die Basalzellen des Hautepithels sind über Hemidesmosomen mit der Lamina lucida verbunden. Ein Drittel der Hemidesmosomen sind mit subbasalen dense plates (SBDP) assoziiert, die sich elektronenmikroskopisch als dichtes lineares Band in den oberen Anteilen der Lamina lucida darstellen [34]. Ankerfilamente (Laminine) verbinden die Hemidesmosomen mit der Lamina densa. Über Verankerungsfibrillen (Kollagen VII) und -plaques (Kollagen IV) ist diese wiederum mit der Lamina fibroreticularis verbunden (Abbildung 1-3).

Die dermoepidermale Grenzzone weist ultrastrukturelle Unterschiede bezüglich der Körperstelle, dem Alter, dem Geschlecht, der Anwesenheit anderer Strukturen und der Art der aufsitzenden Zellen auf. Beispielsweise ist die Lamina densa bei Männern dicker als bei Frauen und die Basallamina unter Melanozyten dünner als unter Keratinozyten [34;113].

1.3. Bindehaut

1.3.1. Aufbau der Bindehaut

Die Bindehaut (Konjunktiva) ist eine gefäßführende Schleimhaut, die als Gleitschicht den Augapfel (Bulbus) und die Innenseite der Augenlider überzieht. Die Conjunctiva bulbi ist auf dem Augapfel leicht verschieblich und haftet dem Hornhautrand (Limbus) fest an. Das mehrschichtig unverhornte Plattenepithel der Bindehaut geht hier in das gefäßlose Epithel der Hornhaut (Kornea) über. Die Conjunctiva tarsi ist fest mit der Innenseite der Lider verbunden und enthält zur Abwehr Lymphfollikel. Im Bindehautsack (Fornix conjunctivae), bildet die lockere Conjunctiva fornicis eine Umschlagfalte zwischen Conjunctiva bulbi und tarsi. So ist die freie Beweglichkeit des Auges in alle Blickrichtungen gewährleistet [12].

1.3.2. Basalmembran der Bindehaut

Über die Basalmembran der Bindehaut ist bisher nur wenig bekannt. Üblicherweise wird die dermoepidermale Grenzzone als Modell verwendet, obwohl Unterschiede zwischen den ineinander übergehenden Basalmembranen der Konjunktiva, des Limbus und der Kornea existieren (Tabelle 1-4) [28;41;65;66;119]. Des Weiteren unterscheidet sich die BM der Bindehaut von denen anderer Schleimhäute, wie der Mundschleimhaut [38]. Das spezifische Verteilungsmuster von BM-Komponenten könnte die variable Beteiligung der Bindehaut bei blasenbildenden Autoimmundermatosen erklären.

BM-Komponente	Hornhaut			Limbus			Bindehaut		
Laminin-1 ($\alpha 1\beta 1\gamma 1$)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Laminin-2 ($\alpha 2\beta 1\gamma 1$)						+			+
Laminin-5 ($\alpha 3\beta 3\gamma 2$)	+	+	+	+	+		+	+	
Laminin $\alpha 1$	+	+/ \emptyset		+	+		+	+	
Laminin $\alpha 2$	\emptyset	\emptyset		+	+	+	+	\emptyset	
Laminin $\alpha 3$	+	+		+	+		+	+	
Laminin $\beta 1$	+	+/ \emptyset		+	+	+	+	+	
Laminin $\beta 2$	\emptyset	\emptyset		+	+	+	+	+	
Laminin $\beta 3$	+	+		+	+		+	+	
Laminin $\gamma 1$	+	+/ \emptyset		+	+	+	+	+	
Laminin $\gamma 2$						+			
Kollagen IV		\emptyset			+			+	
Kollagen IV ($\alpha 1$)	\emptyset			+			+		
Kollagen IV ($\alpha 2$)	\emptyset		\emptyset	+			+		+
Kollagen IV ($\alpha 3$)	+			\emptyset			\emptyset		
Kollagen IV ($\alpha 4$)	+			\emptyset			\emptyset		
Kollagen IV ($\alpha 5$)	+		+	+			\emptyset		\emptyset
Kollagen VII	+	+	+	+	+		+	+	+
$\beta 4$ -Integrin		+			+			+	
Fibronektin	+	+	+	+	+		+	+	+
Entaktin/Nidogen	+			+		+	+		
Perlekan	+			+			+		
Literaturquelle	[66]	[119]	[41]	[66]	[119]	[28]	[66]	[119]	[41]

Tabelle 1-4: Publierte Unterschiede im Nachweis von BM-Komponenten in der Hornhaut, dem Limbus und der Bindehaut

in Klammern die Laminin-/Kollagen-Ketten; + positiv; \emptyset negativ; +/ \emptyset variabel; [Unterschiede in der Literatur](#); [Unterschiede zwischen Hornhaut, Limbus und Bindehaut](#)

1.4. Blasenbildende Autoimmundermatosen

Blasenbildende Autoimmundermatosen sind eine Gruppe von Hautkrankheiten, die durch Autoantikörper gegen Verbindungsstrukturen in der Haut verursacht werden. Die Haut löst sich und bildet Blasen. Je nach Spaltebene können zwei Gruppen unterschieden werden:

1. Pemphigus-Erkrankungen:

Die Antikörper richten sich gegen die Desmosomen der Keratinozyten. Es entstehen intraepidermale Blasen.

2. Pemphigoid-Erkrankungen:

Die Antikörper richten sich gegen Bestandteile der Basalmembran. Die Folge sind subepidermale Blasen.

1.4.1. Schleimhautpemphigoid

Das Schleimhautpemphigoid (engl. mucous membrane pemphigoid, MMP), früher vernarbendes Pemphigoid (engl. cicatricial pemphigoid, CP) genannt, ist eine seltene, chronisch entzündliche Autoimmunerkrankung, die mit subepidermaler Blasenbildung und Vernarbung der Haut und Schleimhäute einhergeht. Vornehmlich sind Mundschleimhaut (ca. 85%) und Bindehaut (ca. 70%) betroffen, seltener Haut (ca. 20%) und andere Schleimhäute [3;26;36;37;112]. Das Schleimhautpemphigoid manifestiert sich überwiegend im sechsten bis siebten Lebensjahrzehnt mit einer Inzidenz von ca. 0,5 Neuerkrankungen/100.000 Einwohner/Jahr [77;129] und einer Prävalenz von 1/15.000 bis 1/40.000 [3;37]. Frauen sind doppelt so häufig betroffen wie Männer [3;36]. Es besteht eine Assoziation mit den HLA-Subtypen -B12, -DR4, -DQw3 und -DQw7 (-DQB1*0301) [2;13;18;74;79;128]. Eine geographische oder ethnische Häufung ist nicht bekannt [3;36]. Zwillingsstudien weisen auf einen multigenetischen Effekt mit Einwirkung von Umwelteinflüssen hin [8].

Das okuläre Schleimhautpemphigoid beginnt meist unilateral, schreitet langsam fort und betrifft im Verlauf auch das zweite Auge. Die klinische Symptomatik kann nach *Tauber* [110] in vier Stadien eingeteilt werden (siehe Tabelle 1-5): Es imponiert zunächst als chronische Bindehautentzündung mit zarter subepithelialer Vernarbung (Stadium I, Abbildung 1-9) und Abflachung des Bindehautsacks (Fornixverkürzung, Stadium II, Abbildung 1-10). Später kommt es zu Verwachsungen zwischen Augapfel- und Lidbindehaut (Symblepharonbildung, Stadium III, Abbildung 1-11) und den äußeren Lidrändern (Ankyloblepharonbildung, Stadium IV, Abbildung 1-12) bis zur vollständigen Verwachsung des Augapfels mit der Lidspalte (eingemauerter Bulbus, Endstadium). Es resultieren Lidfehlstellungen mit Trichiasis (Wimpernreiben auf der Augenoberfläche) und der Gefahr von Hornhautulzerationen durch bakterielle Superinfektion. Obstruktionen der Lidrand- und Tränendrüsenausführungsgänge führen zu extremer Keratokonjunktivitis sicca (trockenes Auge), vollständiger Keratinisierung der Binde- und Hornhaut, Hornhauteintrübung und -vaskularisation. Im Endstadium ist das Auge blind.

Stadium	klinische Symptomatik
I	chronische Konjunktivitis mit subepithelialer Fibrosierung
II	Fornixverkürzung
II a	0-25% Verlust des unteren Fornix
II b	26-50% Verlust des unteren Fornix
II c	51-75% Verlust des unteren Fornix
II d	>75% Verlust des unteren Fornix
III	Symblepharonbildung, Keratopathie, Hornhautvaskularisation
III a	0-25% horizontale Symblephara / n (n = Anzahl der Symblephara)
III b	26-50% horizontale Symblephara / n
III c	51-75% horizontale Symblephara / n
III d	>75% horizontale Symblephara / n
IV	Keratinisierung, Ankyloblepharonbildung, eingemauerter Bulbus

Tabelle 1-5: Klinische Stadieneinteilung des okulären Schleimhautpemphigoids nach *Tauber* [110]

Erläuterungen im Text



Abbildung 1-9: Okuläres Schleimhautpemphigoid, Tauber Stadium I
chronische Konjunktivitis mit subepithelialer Fibrosierung [91]

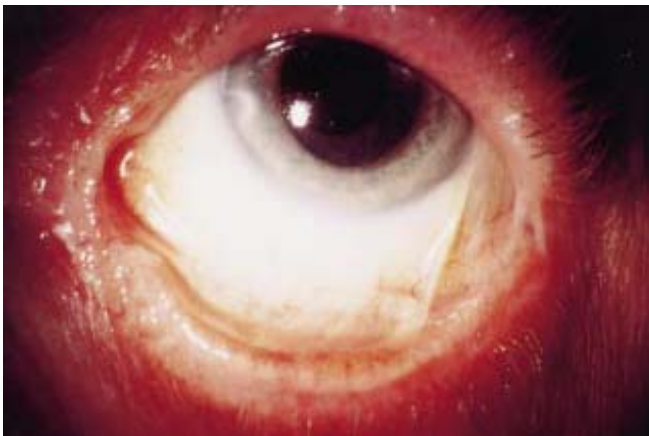


Abbildung 1-10: Okuläres Schleimhautpemphigoid, Tauber Stadium II b
Fornixverkürzung um ca. 50% [91]



Abbildung 1-11: Okuläres Schleimhautpemphigoid, Tauber Stadium III
Symblepharonbildung, Keratopathie, Hornhautvaskularisation [72]



Abbildung 1-12: Okuläres Schleimhautpemphigoid, Tauber Stadium IV

Keratinisierung der Binde- und Hornhaut, Ankyloblepharonbildung, eingemauerter Bulbus [91]

Der genaue Pathomechanismus des Schleimhautpemphigoids ist nicht abschließend geklärt. Vereinfacht handelt es sich um eine Hypersensibilitätsreaktion vom Typ II (zytotoxische Reaktion) [91]: Zirkulierende Autoantikörper reagieren mit Basalmembrananteilen unter Komplementaktivierung und Einleitung einer Immunantwort. Der Entzündungsprozess zerstört die antigenen Basalmembranstrukturen, die Epidermis löst sich ab. Klinisch zeigen sich subepidermale Blasen, die unter gesteigerter Fibroblastenaktivität narbig abheilen [97].

Neben zirkulierenden Antibasalmembran-Autoantikörpern spielen HLA-Subtypen, Immunzellantwort, Zytokine und Mechanismen des "epitope-spreading" eine pathogenetische Rolle [17]. Unter Letzterem versteht man das Demaskieren von immunogenen Strukturen durch vorangegangene entzündliche Prozesse.

Zur Diagnosesicherung werden Bindehautbiopsien aus entzündlich veränderten Arealen histopathologisch und immunhistochemisch untersucht. In der direkten Immunfluoreszenzmikroskopie (DIF) finden sich lineare Ablagerungen von IgG, IgA und Komplementfaktor C3 in der Lamina lucida und densa. Der Nachweis von Immunablagerungen ist beweisend für die Diagnose, gelingt allerdings nur bei etwa 60% der Patienten [17;36;37;91;112].

Als antigene Zielstrukturen konnten Hemidesmosomen und andere Strukturproteine der BMZ nachgewiesen werden (Tabelle 1-6): Das bullöse Pemphigoidantigen 1 und 2 (BPAg1 und 2) [6;76], α 6-Integrin [96], β 4-Integrin [120], Laminin-5 (α 3-, β 3- und γ 2-Kette) [25;52;62], Laminin-6 (α 3-Kette) [17;19], Kollagen Typ VII [67], Uncein [48] sowie folgende, bisher nicht näher charakterisierte Proteine: Ein 45 kD großes, IgA-bindendes Antigen [106], ein 120 kD Protein als mögliches Spaltprodukt von BPAg2 [87] sowie ein 168 kD Protein [42].

Autoantigene	Lokalisation
Bullöses Pemphigoidantigen 1 (BPAg1, BP230)	Hemidesmosomen
Bullöses Pemphigoidantigen 2 (BPAg2, BP180, Kollagen XVII)	Hemidesmosomen/Lamina lucida
α 6-Integrin	Hemidesmosomen/Lamina lucida
β 4-Integrin (205 kD Protein)	Hemidesmosomen/Lamina lucida
Laminin-5 (α 3-, β 3- und γ 2-Kette) (Epiligrin, Kalinin, Nicein, BM600)	Lamina lucida
Laminin-6 (α 3-Kette)	Lamina lucida
Kollagen Typ VII	Lamina densa
Uncein	Lamina densa
45 kD Protein	nicht charakterisiert
120 kD Protein	nicht charakterisiert
168 kD Protein	nicht charakterisiert

Tabelle 1-6: Antigene Zielstrukturen der BMZ beim Schleimhautpemphigoid

(modifiziert nach [17])

Schleimhautpemphigoid-Patienten mit Antikörper gegen Laminin-5 haben ein erhöhtes relatives Risiko an Krebs zu erkranken [30].

Die medikamentöse Therapie des okulären Schleimhautpemphigoids erfolgt bei geringer Aktivität mit Dapson (Diaminodiphenylsulfon) und Tränenersatzmitteln, bei Unverträglichkeit oder schweren Verläufen mit Immunsuppressiva, insbesondere systemische Glukokortikoide in Kombination mit Azathioprin, Cyclophosphamid oder neueren Immunsuppressiva wie Mycophenolat Mofetil. Lokale Steroide sind unwirksam [13;57;91].

Chirurgische Eingriffe, wie Lösung von Symblephara, Amnionmembran-Transplantationen, Keratoplastiken oder Keratoprothesen, können ein akutes Krankheitsgeschehen auslösen und die vernarbenden Prozesse beschleunigen. Eine Operation sollte daher nur im entzündungsfreien Intervall und unter perioperativer Immunsuppression erfolgen [91].

1.4.2. Pseudopemphigoid

Klinisch analoge Veränderungen zum okulären Schleimhautpemphigoid können nach Medikamentengabe beim so genannten Pseudopemphigoid (engl. drug-induced cicatricial pemphigoid, DICC) beobachtet werden, erstmals 1976 von *Patten* beschrieben [88]. Medikamente, die in diesem Zusammenhang erwähnt werden, sind orales Practolol (β -Blocker) [125], topisches Idoxuridin (Virustatikum) [61] sowie die lokalen Antiglaukوماتosa Echothiophat Iodid, Pilocarpin, Epinephrin, Dipivefrin, Guanethidin und Timolol [35;47;83;88;91;93].

1.5. Glaukom

Das Glaukom (Grüner Star) ist nach dem Diabetes mellitus die zweithäufigste Erblindungsursache weltweit [94]. Die Prävalenz liegt bei 1–2% der Gesamtbevölkerung [43] und erhöht sich mit zunehmendem Lebensalter. Es handelt sich um eine Optikoneuropathie mit kontinuierlichem Verlust von Sehnervenfaseren, was bei fortgeschrittener Erkrankung am Sehnervenkopf (Papille) als zunehmende Exkavation sichtbar wird. Als Folge entstehen charakteristische Gesichtsfeldausfälle (Skotome), die im Endstadium zur Erblindung des Auges führen. Als bedeutsamster Risikofaktor wird ein individuell zu hoher Augeninnendruck angesehen. Entscheidend ist ein Missverhältnis von Augeninnendruck und Durchblutung des Sehnervenkopfs: Bei hohem Blutdruck innerhalb der Gefäße des Sehnervenkopfes kann ein hoher Augeninnendruck toleriert werden, bei niedrigem Durchblutungsdruck kann bereits ein niedriger intraokularer Druck (IOD) zum Glaukomschaden führen (so genanntes **Normaldruckglaukom**).

Der Augeninnendruck entsteht durch das Gleichgewicht von Zu- und Abfluss des Kammerwassers im Auge. Die Normwerte liegen bei 10 bis 21 mmHg mit tageszeitlichen Schwankungen von bis zu 5 mmHg [60].

Das Kammerwasser wird von den Ziliarzotten gebildet und in die hintere Augenkammer sezerniert. Es gelangt durch die Pupille in die Vorderkammer und fließt größtenteils im Kammerwinkel durch das Trabekelwerk über den Schlemm-Kanal in die episkleralen Venen ab (Abbildung 1-13). Ein geringer Teil fließt durch die Septen des Ziliarmuskels in das uveosklerale Gefäßsystem.

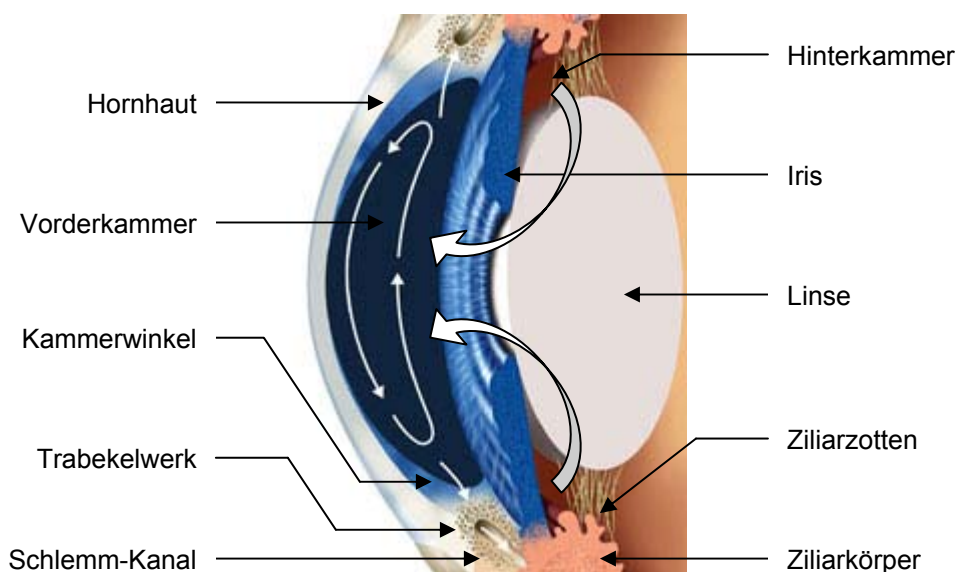


Abbildung 1-13: Kammerwasserzirkulation

Das Kammerwasser wird in den Zotten des Ziliarkörpers gebildet und gelangt aus der Hinterkammer durch die Pupille in die Vorderkammer des Auges. Es fließt größtenteils im Kammerwinkel durch das Trabekelwerk über den Schlemm-Kanal in die episkleralen Venen ab (modifiziert nach www.medizin.de/gesundheits/data_images/low/921-kammerwasser.jpg).

Der Kammerwinkel bezeichnet den Winkel zwischen Hornhaurückfläche und Irisvorderfläche. Je nach Weite lassen sich Offenwinkel- von Engwinkelglaukomen unterscheiden (Tabelle 1-7): Ist der Kammerwinkel offen, aber der Abflusswiderstand erhöht spricht man von Offenwinkelglaukom, ist der Kammerwinkel verlegt und dadurch der Kammerwasserabfluss blockiert, spricht man von Winkelblockglaukom. Primäre Glaukome treten spontan auf, sekundäre Glaukome sind Folge anderer Erkrankungen oder durch Medikamentennebenwirkungen bedingt.

Glaukomform	Häufigkeit	Kammerwinkel
primäres Offenwinkelglaukom	90%	voll einsehbar, offen
sekundäres Offenwinkelglaukom	2–4%	voll einsehbar, verlegt durch PEX-Material, Pigment, Mukopolysachharide, Erythrozyten, Entzündungszellen
primäres Winkelblockglaukom	5%	nicht einsehbar, verlegt durch die Irisbasis
sekundäres Winkelblockglaukom	2–4%	nicht einsehbar, verlegt durch Gefäßneubildungen (Rubeosis iridis), Verwachsungen
kongenitales Glaukom	1%	einsehbar, nicht ausdifferenziert

Tabelle 1-7: Glaukomformen mit Angabe der Häufigkeit und dem Kammerwinkelbefund

PEX = Pseudoexfoliation; (modifiziert nach [60])

1.5.1. Primär chronisches Offenwinkelglaukom

Das primär chronische Offenwinkelglaukom (POWG), auch Glaucoma chronicum simplex genannt, ist mit über 90% aller Glaukome die häufigste Form. Es tritt vornehmlich ab dem 40. Lebensjahr auf und erreicht seinen Gipfel zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr. Familiäre Häufung und genetische Mutationen sind bekannt [100]. Durch degenerative Veränderungen im Kammerwinkel kommt es zur Abflussbehinderung mit chronischem Anstieg des IOD. Da der Betroffene lang keine Beschwerden verspürt, sind ab dem 40. Lebensjahr alle zwei Jahre Vorsorgeuntersuchungen empfehlenswert (*National Institutes of Health*).

Die Therapie erfolgt medikamentös oder operativ. Prinzip der medikamentösen Therapie ist die Hemmung der Kammerwasserproduktion, die Erhöhung des trabekulären/uveoskleralen Abflusses oder die osmotische Volumenreduktion im Auge durch lokale oder systemische Medikamentengabe (Tabelle 1-8).

Wirkstoffgruppe	Wirkstoff	Applikation	Wirkprinzip
Cholinergika (Miotika)	Pilocarpin,	lokal	Erhöhung des trabekulären Abflusses
Cholinesterasehemmer	Carbachol Physostigmin, Neostigmin	lokal	
Prostaglandin-Derivate	Latanoprost, Bimatoprost, Travoprost	lokal	Erhöhung des trabekulären und uveoskleralen Abflusses
direkte Sympathomimetika	Dipivefrin, Brimonidin, Apraclonidin	lokal	Erhöhung des trabekulären Abflusses, Hemmung der Kammerwasserproduktion
β-Blocker	Timolol, Levobunolol, Metipranolol	lokal	Hemmung der Kammerwasserproduktion
indirekte Sympatholytika	Guanethidin	lokal	
Carboanhydrasehemmer	Dorzolamid, Brinzolamid, Acetazolamid	lokal lokal systemisch	
Osmotika	Mannit	systemisch	osmotische Volumenreduktion

Tabelle 1-8: Medikamentöse Glaukomtherapie mit Angabe von Wirkstoffgruppe und -name, Verabreichungsform und Wirkprinzip (modifiziert nach [60])

Mittels Laserverfahren wird der trabekuläre Abfluss erhöht (Argon-Laser-Trabekuloplastik, selektive Laser-Trabekuloplastik), operativ das Kammerwasser aus der Vorderkammer durch eine Skleraöffnung unter die Bindehaut geleitet (Trabekulektomie, ExPress-Implantat), oder der Ziliarkörper destruiert und damit die Kammerwasserproduktion reduziert (Zyklokryokoagulation, Zyklodiathermie, Zyklophotokoagulation).

1.5.2. Sekundäres Offenwinkelglaukom

Beim sekundären Offenwinkelglaukom ist das Trabekelwerk durch vorgelagertes Material verstopft und der Abflusswiderstand des Kammerwassers erhöht. Die Therapie erfolgt in der Regel konservativ durch Behandlung der Grunderkrankung. Die wichtigsten Formen sind:

1.5.2.1. Pseudoexfoliationsglaukom (PEX-Glaukom)

Amorphes, feinfibrilläres (Pseudoexfoliations-)Material, das v. a. vom Ziliarepithel gebildet wird, lagert sich im gesamten vorderen Augensegment ab. Besonders häufig in skandinavischen Ländern.

1.5.2.2. Pigmentdispersionsglaukom

Pigment löst sich vermehrt von der Irisrückfläche und verstopft das Trabekelwerk. Oft sind junge kurzsichtige Männer betroffen.

1.5.2.3. Kortisonglaukom

35–40% der Bevölkerung (so genannte Steroid-Responder) reagieren auf mehrwöchige lokale oder systemische Steroidgabe mit einer vermehrten Ablagerung von Mukopolysacchariden im Trabekelwerk, die nach Absetzen der Steroide reversibel ist.

1.5.2.4. Glaukom durch Entzündungen/Verletzungen

Entzündungsproteine erhöhen die Kammerwasserviskosität, Entzündungszellen, Erythrozyten und Zelldebris verlegen das Trabekelwerk.

1.5.3. Primäres Winkelblockglaukom

In anatomisch prädisponierten Augen (kleine, weitsichtige Augen, dicke Linse, enge Pupille, Iris-Linsen-Verklebungen) ist der Fluss des Kammerwassers durch die Pupille erschwert (Pupillarblock). Der Druck in der Hinterkammer steigt, die Irisbasis wölbt sich vor und verlegt das Trabekelwerk. Es kommt zur plötzlichen Abflussblockade (Winkelblock) mit starkem IOD-Anstieg. Dies kann zum Glaukomanfall führen mit steinhartem Bulbus, starken Schmerzen, Übelkeit/ Erbrechen und Sehkraftminderung, der unbehandelt zur Erblindung führen kann.

Die Therapie wird konservativ eingeleitet mit anschließendem operativem Anlegen eines Hinterkammer-Vorderkammer-Shunts (YAG-Laser-Iridotomie, chirurgische Iridektomie).

Wird ein Glaukomanfall nicht rechtzeitig behandelt, kann es zu Verklebungen des Kammerwinkels kommen (Goniosynechien), die zu einer chronischen IOD-Steigerung führen. Man spricht dann vom chronischen Winkelblockglaukom.

1.5.4. Sekundäres Winkelblockglaukom

Hier wird der Kammerwinkel durch pathologische Vorgänge verschlossen. Zu den häufigsten Ursachen zählen:

1.5.4.1. Neovaskularisationsglaukom

Ischämische Netzhauterkrankungen können zur pathologischen Neubildung von Irisgefäßen (Rubeosis iridis) führen, die den Kammerwinkel reißverschlussartig zuziehen.

1.5.4.2. Posttraumatisches Glaukom

Nach einem Bulbustrauma kann es zu Verwachsungen im Bereich des Kammerwinkels (vordere Synechien) kommen, bedingt durch die Organisation von Blut/Exsudat oder durch den andauernden Kontakt von Iris und Trabekelwerk bei aufgehobener Vorderkammer nach perforierenden Verletzungen.

1.5.5. Kongenitales Glaukom

Beim kongenitalem Glaukom ist genetisch bedingt das Trabekelwerk nicht ausdifferenziert oder durch embryonales Gewebe verlegt. Es kommt zum Druckanstieg mit Dilatation der noch weichen Bulbuswand. Klinisch zeigt sich ein "großes Auge" (Buphthalmus) mit progressivem Hornhautdurchmesser.

Die Therapie erfolgt durch chirurgische Eröffnung des Kammerwasserabflusses (Goniotomie, Trabekulotomie).

2. Ziele der Arbeit

Basalmembranen werden von einer Reihe unterschiedlicher Matrixproteine aufgebaut, deren Zusammensetzung unter anderem von der Gewebeart abhängig ist. Über die Basalmembran der Bindehaut ist bisher nur wenig bekannt. Typischerweise wird die Basalmembran der Haut als Modell verwendet, ohne die Selektivität der verschiedenen Basalmembranen zu berücksichtigen.

Beim Schleimhautpemphigoid kommt es zur Autoantikörper-vermittelten Typ II-Immunreaktion gegen Antigene der BMZ von Haut und Schleimhaut mit nachfolgender Desintegration der BMZ und subepidermaler Blasenbildung. Es ist nicht bekannt, warum diese Erkrankung bevorzugt ältere Menschen und das weibliche Geschlecht betrifft. Die Prozesse, die zu einer okulären Beteiligung führen, sind unklar. Bislang gibt es keine Angaben über Veränderungen der konjunktivalen BMZ im Alter oder geschlechtsspezifische Unterschiede.

Es ist nicht bekannt, inwieweit strukturelle Veränderungen oder immunologische Prozesse im Bereich der BMZ der Bindehaut zu anderen vernarbenden Erkrankungen, wie dem Pseudopemphigoid beitragen. Die Rolle von Arzneimitteln (v. a. lokale Antiglaukوماتosa) bzw. Konservierungsstoffen in diesem Zusammenhang ist ungeklärt.

Basierend auf den bisherigen Ausführungen sollen in der vorliegenden Arbeit folgende Fragen beantwortet werden:

- Welche Unterschiede bestehen im Aufbau der BMZ von Haut und Bindehaut?
- Lassen sich im Alter Veränderungen an der BMZ der Bindehaut nachweisen?
- Zeigen sich geschlechtsspezifische Unterschiede im Aufbau der BMZ der Konjunktiva?
- Führt die chronische antiglaukomatöse Medikamentenapplikation zu Veränderungen an der BMZ der Bindehaut, die letztlich eine autoimmune Entzündung und Vernarbung begünstigen oder verursachen?

3. Material und Methoden

3.1. Patientengut

Für die Untersuchungen wurden Gewebeproben verwendet, die bei operativen Eingriffen an der LMU-Augenklinik (München) entnommen wurden. Gesunde Bindehaut wurde im Rahmen von Vitrektomien und Skleraplobenaufnähtungen gewonnen, konjunktivale Biopsien von Glaukompatienten im Rahmen von Trabekulektomien. Als Kontrollgewebe diente gesunde Oberlidhaut, die bei einer Dermatochalasis-Operation entfernt wurde. Die Genehmigung der Ethikkommission und die Einwilligung der Patienten zur Gewebeentnahme und anschließender immunhistologischer Untersuchung wurden eingeholt.

41 Bindehautbiopsien stammten von Patienten mit gesunder Konjunktiva, darunter 20 Frauen im Alter von 33 bis 92 Jahren und 21 Männer im Alter von 15 bis 84 Jahren (Abbildung 3-1). Das Durchschnittsalter betrug 58 Jahre für die weibliche Gruppe, 59 Jahre für die männliche und 58 Jahre für alle Bindehaut-Gesunden.

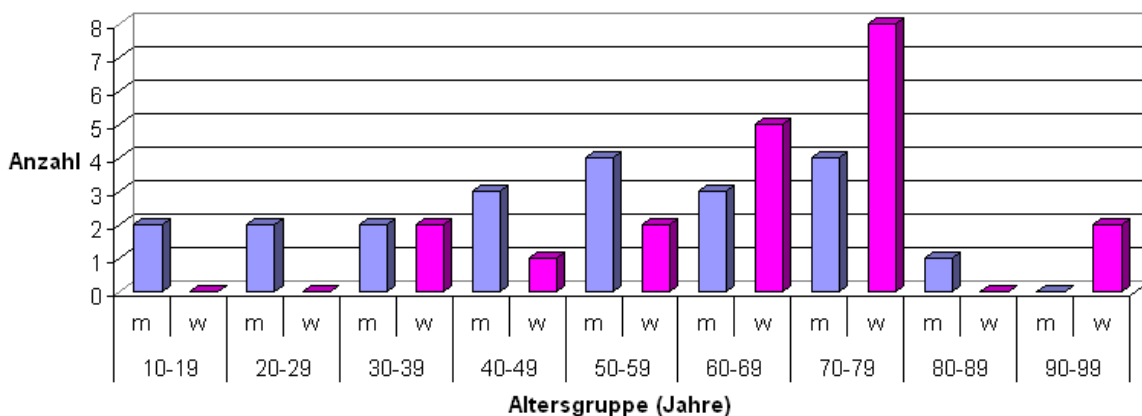


Abbildung 3-1:

Verteilung der Patienten mit gesunder Konjunktiva nach Altersgruppe und Geschlecht

49% Frauen im Durchschnittsalter von 58 Jahren, 51% Männer mit durchschnittlich 59 Jahren

16 Bindehautbiopsien wurden von Glaukompatienten mit lokaler antiglaukomatöser Therapie gewonnen. Keiner der Patienten zeigte zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme fibrotische Bindehautveränderungen. Das Durchschnittsalter der 16 Glaukompatienten betrug 66 Jahre, darunter 6 Frauen im Alter von 10 bis 90 Jahren (Durchschnittsalter 67 Jahre) und 10 Männer im Alter von 46 bis 83 Jahren (Durchschnittsalter 66 Jahre) (Abbildung 3-2).

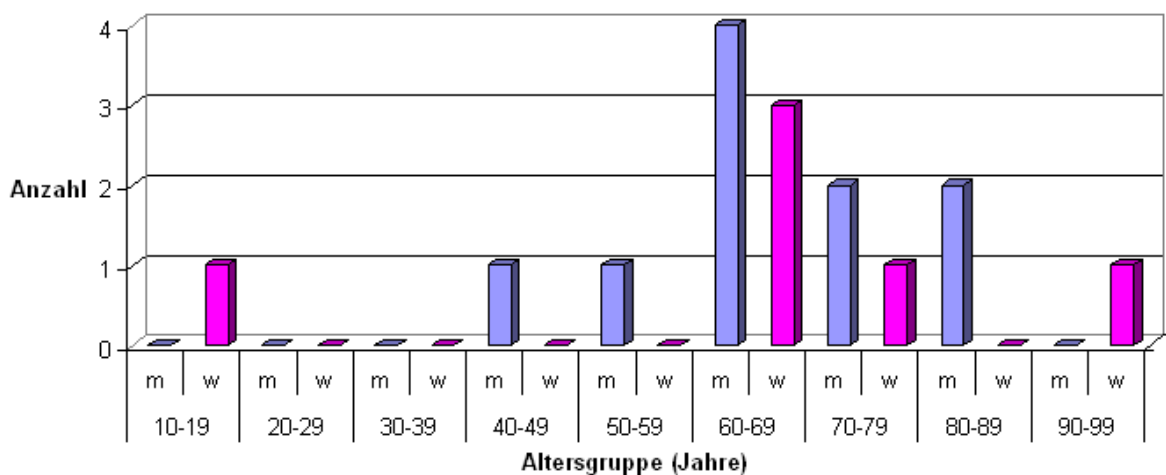


Abbildung 3-2: Verteilung der Glaukompatienten nach Altersgruppe und Geschlecht

37,5% Frauen im Durchschnittsalter von 67 Jahren, 62,5% Männer mit durchschnittlich 66 Jahren

Die Glaukomform, die anfängliche und aktuelle Medikation sowie die Dauer der medikamentösen Therapie wurden dokumentiert (Tabelle 3-1). 6 Patienten litten an Pseudoexfoliationsglaukom (PEX-Glaukom), 5 Patienten an primär chronischem Offenwinkelglaukom (POWG), 3 an Sekundärglaukom und 2 Patienten an chronischem Winkelblockglaukom (CWBG).

Antiglaukomatosa wurden als Monotherapie oder bei fortgeschrittener Erkrankung in Kombinationen lokal appliziert (Tabelle 3-1). Tabelle 3-2 zeigt eine Auflistung der von den Patienten angewandten Präparate und ihrer Wirkstoffgruppe. Zum Einsatz kamen β -Blocker (14 Patienten), Prostaglandin-Derivate (PGD) (12 Patienten), Carboanhydrasehemmer (CAH) (11 Patienten), Sympathomimetika (6 Patienten) und Cholinergika (4 Patienten). Die Dauer der antiglaukomatösen Therapie betrug je nach Patient 4 Monate bis zu 34 Jahre (im Mittel 9,7 Jahre).

Fall-Nr.	Alter (Jahre)	Ges.	Glaukom-Form	Medikation (Wirkstoffgruppe)		Therapiedauer (Jahre)
				zu Beginn	dann in Kombination mit	
1	59	m	PEX-Glaukom	PGD		4
2	10	w	Sekundärglaukom	β-Blocker	CAH, PGD, Symp.	2
3	83	m	CWBG	β-Blocker	Cholinergikum	24
4	62	m	POWG	β-Blocker	CAH, PGD	3
5	66	w	POWG	PGD	Symp.	1
6	64	m	POWG	β-Blocker	CAH, PGD, Symp.	6
7	81	m	PEX-Glaukom	β-Blocker	CAH	10
8	67	m	PEX-Glaukom	β-Blocker	CAH, PGD, Chol.	0,8
9	77	m	PEX-Glaukom	β-Blocker	CAH, PGD	0,7
10	71	w	POWG	β-Blocker	CAH, PGD, Symp.	11
11	65	w	PEX-Glaukom	β-Blocker	CAH, PGD	0,3
12	90	w	Sekundärglaukom	β-Blocker	CAH, PGD, Symp.	4
13	71	w	CWBG	β-Blocker	Cholinergikum	23
14	46	m	PEX-Glaukom	β-Blocker	CAH, PGD, Symp.	1
15	63	m	Sekundärglaukom	β-Blocker	Cholinergikum	34
16	75	m	POWG	β-Blocker	CAH, PGD	30

Tabelle 3-1: Glaukompatienten mit Angabe der Glaukomform, der anfänglichen und jetzigen medikamentösen Therapie und ihrer Dauer. PEX = Pseudoexfoliation; CWBG = chronisches Winkelblockglaukom; POWG = primär chronisches Offenwinkelglaukom; CAH = Carboanhydrasehemmer; PGD = Prostaglandin-Derivat; Symp. = Sympathomimetikum

Wirkstoffgruppe	Wirkstoff	Medikament (Handelsname)	Konzentration
β-Blocker	Timolol	Tim-Ophthal AT	5 mg/ml
Carboanhydrasehemmer	Brinzolamid	Azopt AT	10 mg/ml
	Dorzolamid	Trusopt AT	20 mg/ml
+ β-Blocker	Dorzolamid, Timolol	Cosopt AT	20 mg/ml + 5 mg/ml
Cholinergikum	Pilocarpin	Pilocarpol AT	20 mg/ml
	Pilocarpin	Pilomann AT	20 mg/ml
+ β-Blocker	Pilocarpin, Metipranolol	Normoglaucan AT	20 mg/ml + 1 mg/ml
Prostaglandin-Derivat	Bimatoprost	Lumigan AT	0,3 mg/ml
	Travoprost	Travatan AT	40 µg/ml
	Latanoprost	Xalatan AT	50 µg/ml
Sympathomimetikum	Brimonidin	Alphagan AT	2 mg/ml

Tabelle 3-2: Antiglaukomatöse Medikation der untersuchten Patienten mit Angabe von Wirkstoffgruppe und -name, Handelsname, Verabreichungsform (AT = Augentropfen) und Wirkstoffkonzentration

3.2. Antikörper

Zur Anwendung kamen folgende Primärantikörper gegen epitheliale Basalmembrankomponenten (Tabelle 3-3):

Antigen	Antikörpertyp	Klon	Herkunft	Verdün.
Laminin α	monoklonal Maus	4C7	DakoCytomation, Inc., Carpinteria, USA	1:25
Laminin $\alpha 1$	polyklonal Kaninchen	H-300	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA	1:300
Laminin $\alpha 2$	polyklonal Ziege	P-20	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA	1:300
Laminin $\alpha 3$	polyklonal Ziege	C-19	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA	1:750
Laminin $\beta 1$	monoklonal Maus	D-9	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA	1:10
Laminin $\beta 3$	polyklonal Ziege	C-19	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA	1:300
Laminin $\gamma 1$	monoklonal Maus	D-3	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA	1:100
Laminin $\gamma 2$	polyklonal Ziege	4G1	DakoCytomation A/S, Glostrup, Dänemark	1:300
Laminin $\gamma 3$	polyklonal Ziege	C-19	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA	1:300
Kalinin	monoklonal Maus	GB3	ImmunologicalsDirect.com, Oxford, UK	1:500
$\beta 4$ -Integrin	monoklonal Maus	450-9D	Serotec, Inc., Raleigh, USA	1:1500
Kollagen IV	monoklonal Maus	CIV 22	DakoCytomation A/S, Glostrup, Dänemark	1:200
Kollagen VII	polyklonal Ziege	N-15	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA	1:300

Tabelle 3-3: Primärantikörper mit Angabe von Typ, Klon, Herkunft und eingesetzter Verdünnung

Als Sekundärantikörper wurden Kaninchen-Anti-Maus-AK (Dako ChemMate™ Detection Kit APAAP, Mouse, USA) und je nach Primärantikörpertyp zusätzlich Maus-Anti-Ziege-AK bzw. Maus-Anti-Kaninchen-AK (dianova, Hamburg, Deutschland) verwendet.

3.3. Immunhistochemie

3.3.1. Gewebepvorbereitung

Die intraoperativ entnommenen nativen Bindehaut- bzw. Hautbiopsien wurden sofort in OCT-Medium (Tissue-Tek, Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Niederlande) bei -60°C schnellgefroren.

3.3.2. Anfertigen von Gefrierschnitten

Mit Hilfe eines Kryostaten (Cryo-Star HM 560 MV, Microm GmbH, Valldorf, Deutschland) wurden bei -20°C Geräte-Innentemperatur und -15°C Messertemperatur Gefrierschnitte mit einer Dicke von $8\text{ }\mu\text{m}$ angefertigt und auf Poly-L-Lysin-beschichteten Superfrost-Objektträgern (Schubert & Weiß, München, Deutschland) aufgezogen. Nach 10 Minuten Lufttrocknungszeit wurden die Präparate bei -30°C aufbewahrt.

3.3.3. Fixierung

Die bei -30°C gelagerten Präparate wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend für 15 Minuten in eiskaltem Aceton ($0-4^{\circ}\text{C}$) (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) fixiert. Nach Lufttrocknung wurde der Gewebeschnitt auf dem Objektträger mit einem speziellen Stift umfahren (DakoCytomation Pen, DakoCytomation, Denmark A/S, Glostrup, Dänemark), um das Abfließen der nachfolgenden Reagenzien zu vermeiden.

3.3.4. Alkalische Phosphatase-antialkalische Phosphatase (APAAP)-Methode

Die APAAP-Methode ist eine indirekte Methode zum Nachweis von Antigenstrukturen. Es werden lösliche Enzym-Immun-Komplexe (APAAP-Komplexe) zur Signalverstärkung und damit zu einer Erhöhung der Sensitivität eingesetzt.

Der Primärantikörper richtet sich gegen das Antigen, in unserem Falle gegen Basalmembranstrukturen humaner Haut und Bindehaut.

Der Sekundärantikörper fungiert als Brückenantikörper und muss gegen die Immunglobuline der Spezies gerichtet sein, aus dessen Serum der Primärantikörper und der Antikörper im APAAP-Komplex gewonnen wurden (hier: Kaninchen-Anti-Maus-Sekundärantikörper, Dako ChemMate™ Detection Kit APAAP, Mouse, USA) (Abbildung 3-3).

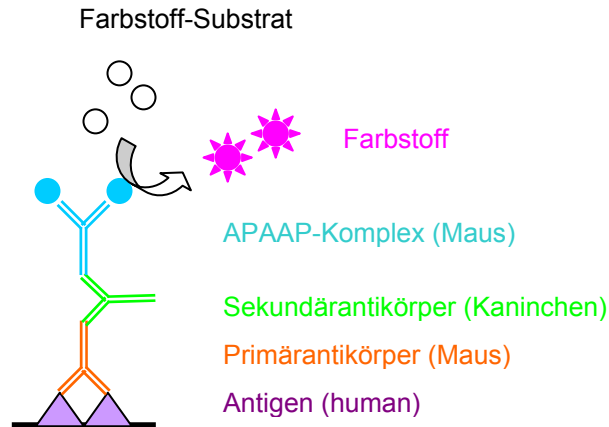


Abbildung 3-3: APAAP-Methode, in Klammern die Speziesherkunft

In dieser Arbeit wurden Primärantikörper von Maus, Ziege und Kaninchen verwendet. Der APAAP-Komplex stammt von der Maus (Dako ChemMate™ Detection Kit APAAP, Mouse, USA). Für die Verbindung von Ziege-/Kaninchen-Primärantikörper und Sekundärantikörper wurde ein weiterer Brückenantikörper verwendet: Maus-Anti-Ziege- bzw. Maus-Anti-Kaninchen-Antikörper (dianova, Hamburg, Deutschland) (Abbildung 3-4).

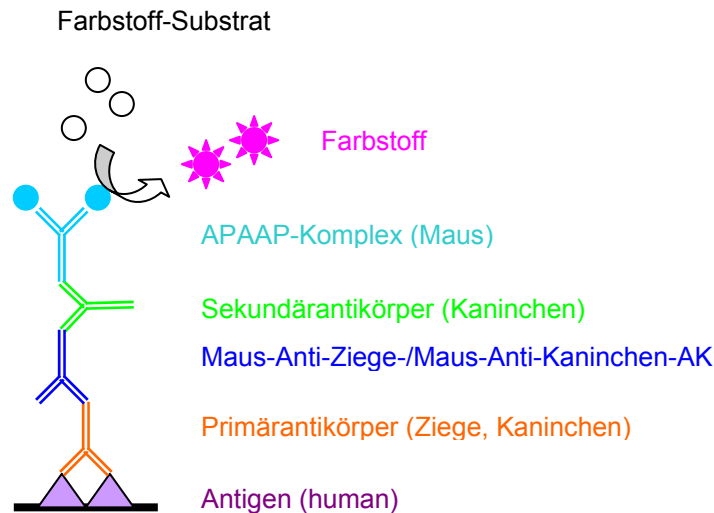


Abbildung 3-4: APAAP-Methode mit weiterem Brückenantikörper, in Klammern die Speziesherkunft

Die AG-AK-Reaktion wird durch eine Enzym-Substrat-Reaktion visualisiert, bei der ein Farbstoff entsteht (Neufuchsin, Dako ChemMate™ Detection Kit APAAP, Mouse, USA).

Das genaue Färbeprotokoll und der Ansatz der Reagenzien sind im Anhang wiedergegeben.

3.3.5. Gegenfärbung und Einbettung

Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte für 1–2 Minuten mit saurem Hämalaun nach Paula Mayer (Apotheke Innenstadt Universität München, Deutschland). Die Präparate wurden mit 37°C warmer Kaisers Glyceringelatine eingebettet (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland).

3.3.6. Färbekontrollen

Als Negativkontrolle diente gesunde Bindehaut, die unter Ausschluss des Primärantikörpers das gleiche Färbeprotokoll durchlief. Die Positivkontrolle entsprach gesunder Lidhaut.

3.3.7. Vergleichbarkeit der Präparate

Zufällige Fehler, wie unterschiedliche Raumtemperatur, Wechsel von Pipetten oder Neuansetzen von Reagenzien, bewirken eine Streuung der Farbergebnisse von Tag zu Tag. Um die immunhistochemische Färbung der Präparate durch einen Antikörper untereinander vergleichen zu können, wurde ein Schnitt jeder Bindehautbiopsie in Serie am gleichen Tag mit demselben Antikörper gefärbt.

3.4. Auswertung und Dokumentation der Ergebnisse

Die Auswertung erfolgte optisch mit Hilfe eines Zeiss-Fotomikroskops (Carl Zeiss, Deutschland). Bewertet wurde das Vorhandensein einer immunreaktiven Färbung von Epithel, BMZ und Gefäßen (+ Färbung, ø keine Färbung) bei 25 facher Vergrößerung. Eine Serie wurde blind von zwei unabhängigen Personen bewertet. Mit Hilfe der integrierten Lichtbildkamera wurde ein repräsentativer Präparate-ausschnitt fotografisch dokumentiert.

3.5. Statistik

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Software SPSS der Firma SPSS Inc.. Wegen dichotomer Verteilung der Variablen wurde der Chi-Quadrat-Test nach Pearson angewandt sowie der exakte Test nach Fisher bei Teilmengen kleiner 4. Ein Ergebnis wurde als signifikant angesehen, wenn der angenommene Fehler erster Art höchstens 5 Prozent betrug ($p \sim 0,05$).

4. Ergebnisse

4.1. Gesunde Bindehaut

Antigen	Epithel	BMZ	Gefäße
Laminin α	\emptyset (36/41 = 88%)	+	+
Laminin $\alpha 1$	+	n.a.	+
Laminin $\alpha 2$	$\emptyset/+$ (\emptyset : 25/41 = 61%)	$\emptyset/+$ (\emptyset : 25/41 = 61%)	$\emptyset/+$ (\emptyset : 22/41 = 54%)
Laminin $\alpha 3$	+	n.a.	\emptyset
Laminin $\beta 1$	\emptyset (\emptyset : 35/41 = 85%)	\emptyset (\emptyset : 35/41 = 85%)	$\emptyset/+$ (\emptyset : 28/41 = 68%)
Laminin $\beta 3$	\emptyset (38/41 = 93%)	\emptyset (38/41 = 93%)	\emptyset (40/41 = 98%)
Laminin $\gamma 1$	+	n.a.	+
Laminin $\gamma 2$	$\emptyset/+$ (\emptyset : 27/41 = 66%)	$\emptyset/+$ (\emptyset : 27/41 = 66%)	\emptyset (41/41 = 100%)
Laminin $\gamma 3$	\emptyset (38/41 = 93%)	\emptyset (38/41 = 93%)	\emptyset (36/41 = 88%)
Kalinin	\emptyset (41/41 = 100%)	+	\emptyset (41/41 = 100%)
$\beta 4$ -Integrin	+	n.a.	+
Kollagen IV	\emptyset (41/41 = 100%)	+	+
Kollagen VII	+	n.a.	\emptyset
	(29/41 = 71%)	(25/41 = 61%, + : 4/41 = 10%)	(37/41 = 90%)

Tabelle 4-1: Immunhistochemische Färbeergebnisse der gesunden Bindehäute

+ Färbung; \emptyset keine Färbung; $\emptyset/+$ Färbung variabel, jedoch überwiegend negativ; n.a. nicht abgrenzbar; in Klammern Angabe des Färbergebnis in Fallzahl und Prozent

Die BMZ der gesunden Bindehaut färbte sich größtenteils positiv für Laminin α , Kalinin und Kollagen IV (Abbildung 4-1). Die Verteilung von Laminin $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\gamma 1$, $\beta 4$ -Integrin und Kollagen VII war diffus im Bindehautepithel mit Betonung der basalen Epithelschichten und der BMZ zu sehen (Abbildung 4-2). Laminin $\alpha 2$ und $\gamma 2$ zeigten im Epithel und in der BMZ eine variable Anfärbung, die jedoch überwiegend negativ ausfiel und weder geschlechts- noch altersabhängig war. Laminin $\beta 1$, $\beta 3$ und $\gamma 3$ konnten beim größten Teil weder im Epithel, noch in der BMZ der Bindehaut nachgewiesen werden (Abbildung 4-3).

Die Gefäße der Bindehaut waren überwiegend positiv für Laminin α , $\alpha 1$, $\gamma 1$, $\beta 4$ -Integrin sowie Kollagen IV (Abbildung 4-1 und Abbildung 4-2) und zeigten eine variable Anfärbung für Laminin $\alpha 2$ und $\beta 1$ (Abbildung 4-4 und Abbildung 4-13).

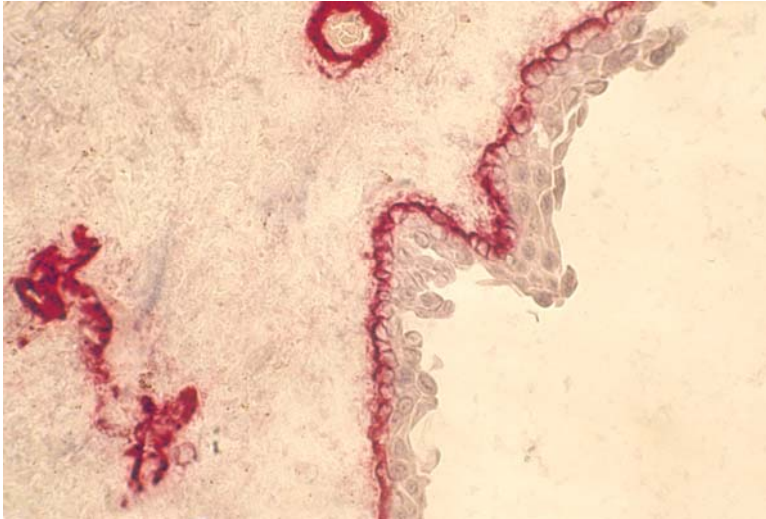


Abbildung 4-1: Kollagen IV, gesunde Bindehaut, 20x

Positive Anfärbung der BMZ von Epithel und Gefäßen

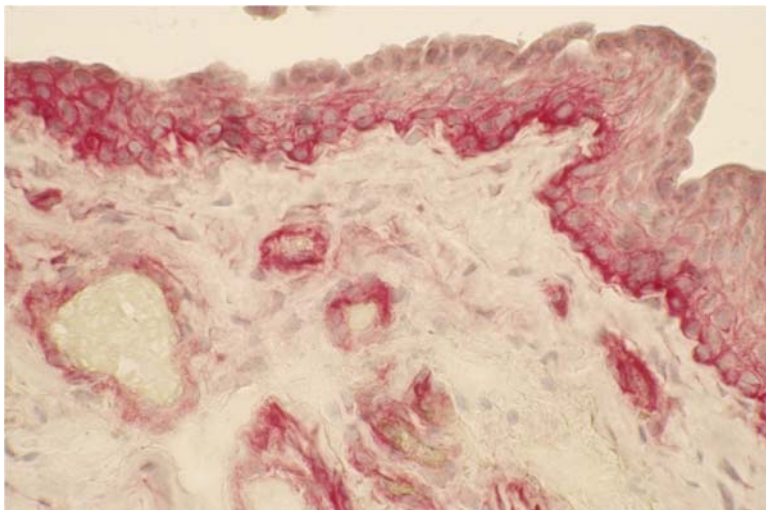


Abbildung 4-2: $\beta 4$ -Integrin, gesunde Bindehaut, 25x

Diffuse Verteilung im Bindehautepithel mit Betonung der basalen Epithelschichten und der BMZ; Gefäße positiv

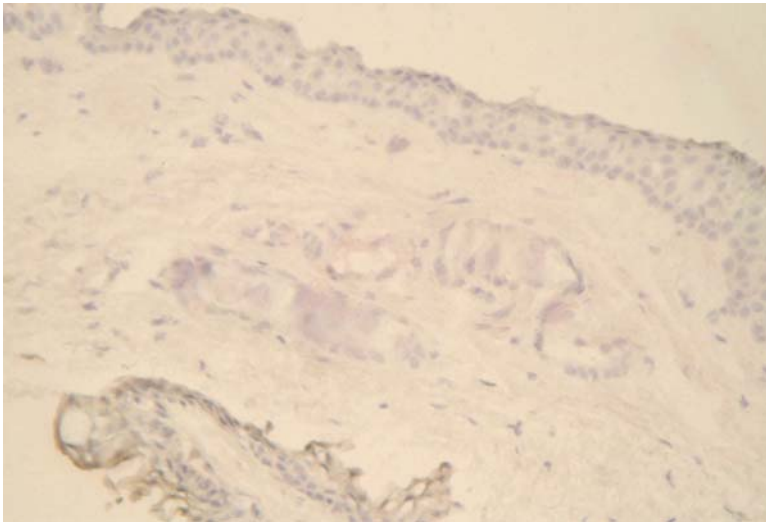


Abbildung 4-3: Laminin $\gamma 3$, gesunde Bindehaut, 20x

Keine Färbung der BMZ von Epithel und Gefäßen

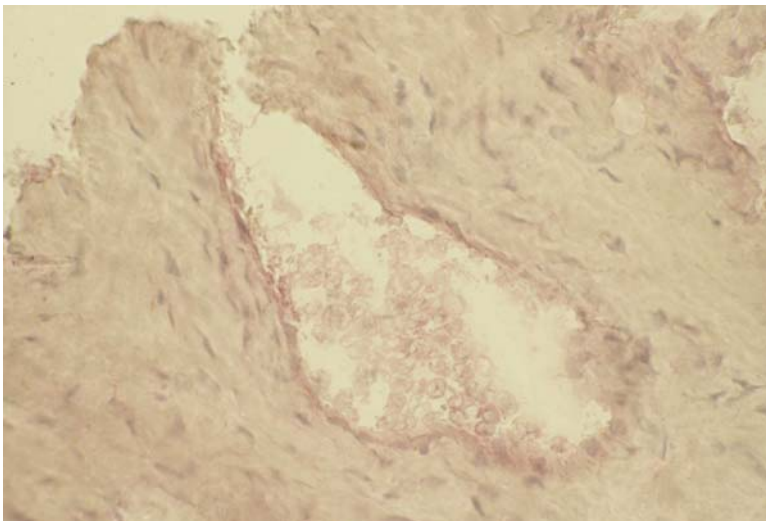


Abbildung 4-4: Laminin $\beta 1$, Bindehautgefäß, 25x

Variable Anfärbung der Gefäße, hier positiv (vergleiche Abbildung 4-13)

4.2. Bindehaut bei Glaukom

Antigen	Epithel	BMZ	Gefäße
Laminin α	\emptyset (11/16 = 69%)	+	+
Laminin $\alpha 1$	+	n.a.	+
Laminin $\alpha 2$	\emptyset (14/16 = 87,5%)	\emptyset (14/16 = 87,5%)	$\emptyset/+$ (\emptyset : 11/16 = 69%)
Laminin $\alpha 3$	+	n.a.	\emptyset
Laminin $\beta 1$	+	n.a.	$\emptyset/+$
Laminin $\beta 3$	\emptyset (16/16 = 100%)	\emptyset (16/16 = 100%)	\emptyset (15/16 = 94%)
Laminin $\gamma 1$	+	+	+
Laminin $\gamma 2$	+	n.a.	\emptyset
Laminin $\gamma 3$	\emptyset (16/16 = 100%)	\emptyset (16/16 = 100%)	\emptyset (16/16 = 100%)
Kalinin	\emptyset (16/16 = 100%)	+	\emptyset
$\beta 4$ -Integrin	+	n.a.	+
Kollagen IV	\emptyset (16/16 = 100%)	+	+
Kollagen VII	+	n.a.	\emptyset

Tabelle 4-2: Immunhistochemische Färbeergebnisse der Bindehäute bei Glaukom

+ Färbung; \emptyset keine Färbung; $\emptyset/+$ Färbung variabel, jedoch überwiegend negativ; n.a. nicht abgrenzbar; in Klammern Angabe des Färbergebnis in Fallzahl und Prozent

Die BMZ der Bindehaut bei Glaukom färbte sich positiv für Laminin α , Kalinin (Abbildung 4-5) und Kollagen IV mit Beteiligung des Epithels bei Laminin $\gamma 1$ (Abbildung 4-6). Die Verteilung von Laminin $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\beta 1$, $\gamma 2$, $\beta 4$ -Integrin und Kollagen VII war diffus im Bindehautepithel mit Betonung der basalen Epithelschichten und der BMZ zu sehen (Abbildung 4-7). Laminin $\alpha 2$, $\beta 3$ und $\gamma 3$ konnten beim überwiegenden Teil weder im Epithel, noch in der BMZ der Bindehaut nachgewiesen werden (Abbildung 4-8).

Die Gefäße der Bindehaut bei Glaukom waren größtenteils positiv für Laminin α (Abbildung 4-9), $\alpha 1$, $\gamma 1$, $\beta 4$ -Integrin sowie Kollagen IV und zeigten eine variable Anfärbung für Laminin $\alpha 2$ und $\beta 1$.

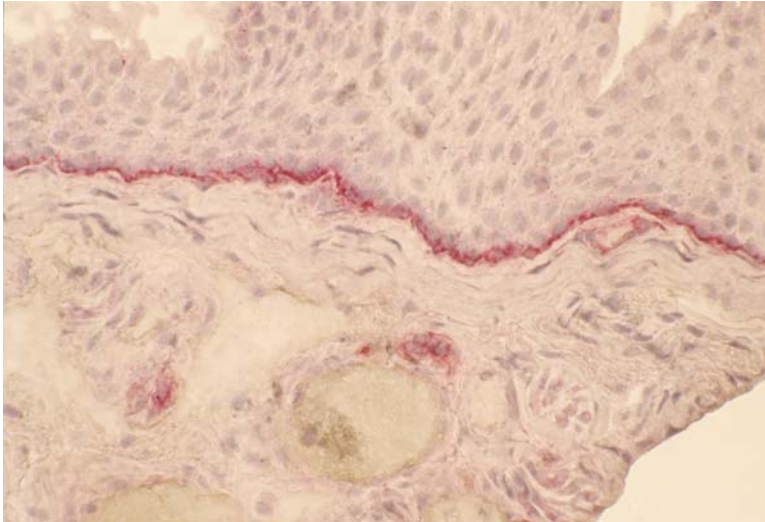


Abbildung 4-5: Kalinin, Bindehaut bei Glaukom, 25x

Positive Anfärbung der BMZ; Gefäße negativ

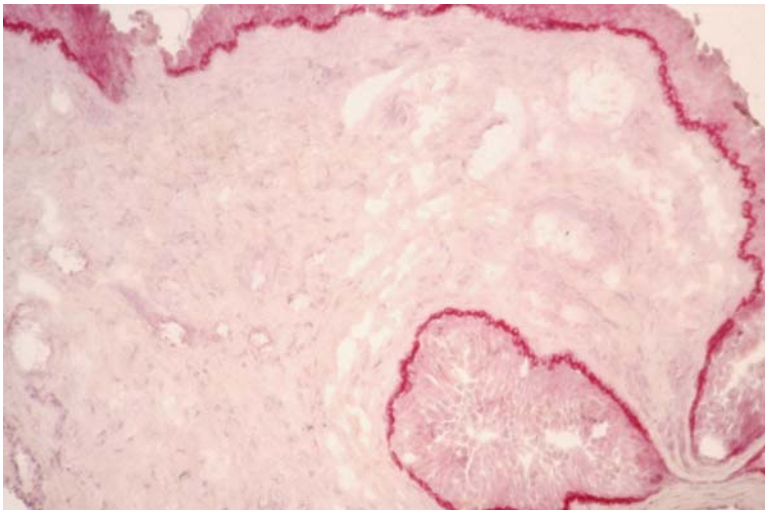


Abbildung 4-6: Laminin γ 1, Bindehaut bei Glaukom, 10x

BMZ deutlich, Epithel und Gefäße (linker Bildrand) schwach positiv

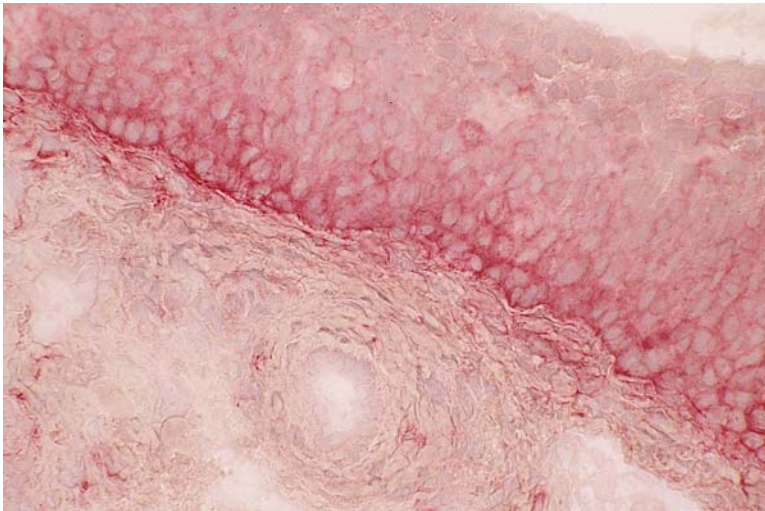


Abbildung 4-7: Laminin $\alpha 3$, Bindehaut bei Glaukom, 25x

Diffuse Verteilung im Bindehautepithel mit Betonung der basalen Epithelschichten und der BMZ;
Gefäße negativ

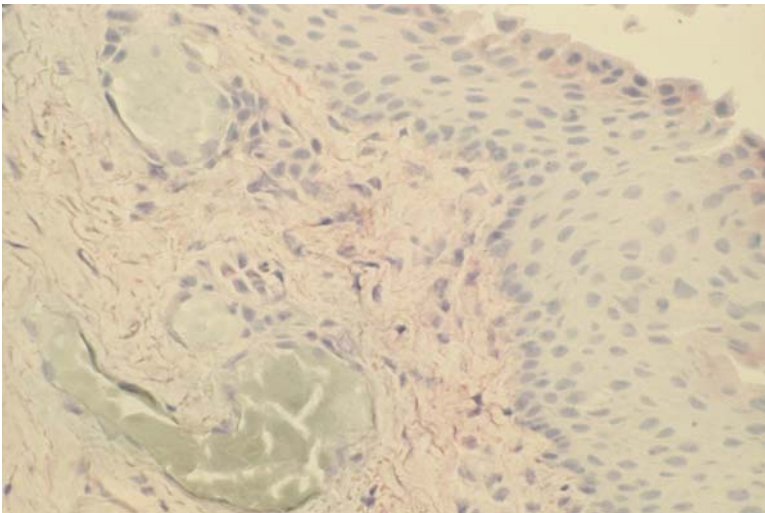


Abbildung 4-8: Laminin $\beta 3$, Bindehaut bei Glaukom, 25x

Epithel, BMZ und Gefäße negativ

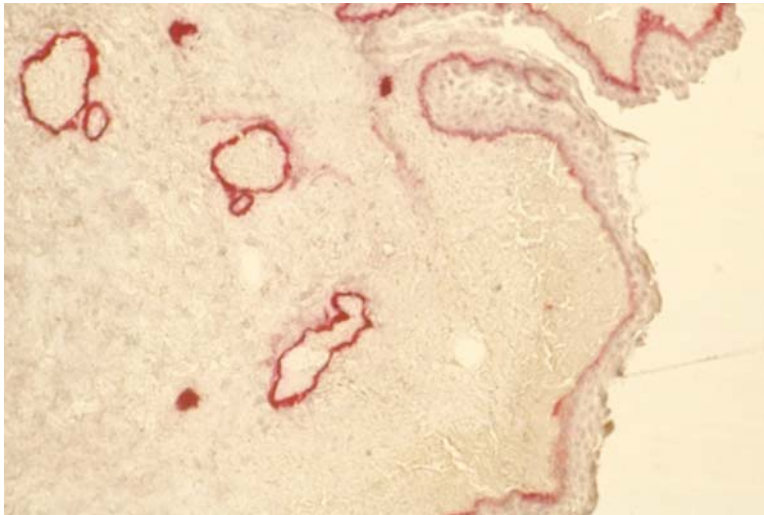


Abbildung 4-9: Laminin α , Bindehaut bei Glaukom, 10x

Positiver Nachweis in der BMZ von Epithel und Gefäßen

4.3. Lidhaut

Antigen	Epithel	BMZ	Gefäße
Laminin α	Ø	+	+
Laminin $\alpha 1$	+	+	+
Laminin $\alpha 2$	+	n.a.	+
Laminin $\alpha 3$	+	n.a.	Ø
Laminin $\beta 1$	+	n.a.	+
Laminin $\beta 3$	+	+	Ø
Laminin $\gamma 1$	+	n.a.	+
Laminin $\gamma 2$	Ø	+	Ø
Laminin $\gamma 3$	+	n.a.	+
Kalinin	Ø	+	Ø
$\beta 4$ -Integrin	+	+	+
Kollagen IV	Ø	+	+
Kollagen VII	+	n.a.	Ø

Tabelle 4-3: Immunhistochemische Färbeergebnisse der Lidhaut (Positivkontrolle)

+ Färbung; Ø keine Färbung; n.a. nicht abgrenzbar

Die BMZ der Lidhaut färbte sich positiv für Laminin α , $\alpha 1$, $\beta 3$, $\gamma 2$, Kalinin, $\beta 4$ -Integrin und Kollagen IV (Abbildung 4-10) mit Beteiligung des Epithels bei Laminin $\alpha 1$, $\beta 3$ und $\beta 4$ -Integrin (Abbildung 4-11). Die Verteilung von Laminin $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 1$, $\gamma 1$, $\gamma 3$ und Kollagen VII war diffus im Hautepithel mit Betonung der basalen Epithelschichten und der BMZ zu sehen (Abbildung 4-12).

Die Gefäße der Lidhaut waren positiv für Laminin α , $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\gamma 1$, $\gamma 3$, $\beta 4$ -Integrin und Kollagen IV (Abbildung 4-10 und Abbildung 4-11).

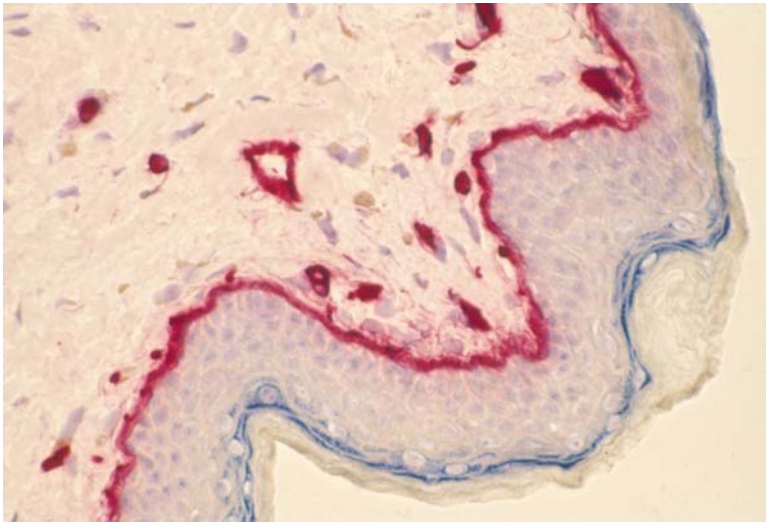


Abbildung 4-10: Kollagen IV, Lidhaut, 25x

Positive Anfärbung der BMZ von Epithel und Gefäßen

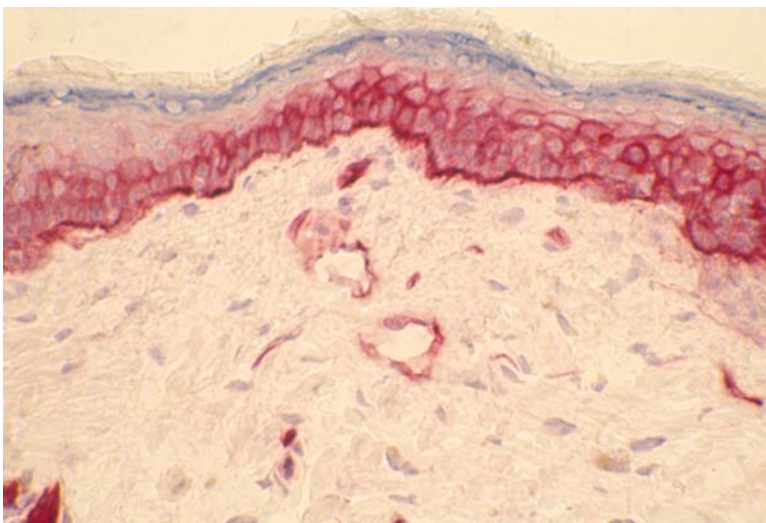


Abbildung 4-11: $\beta 4$ -Integrin, Lidhaut, 20x

Positiver Nachweis in der BMZ, um Epithelzellen und in den Gefäßen

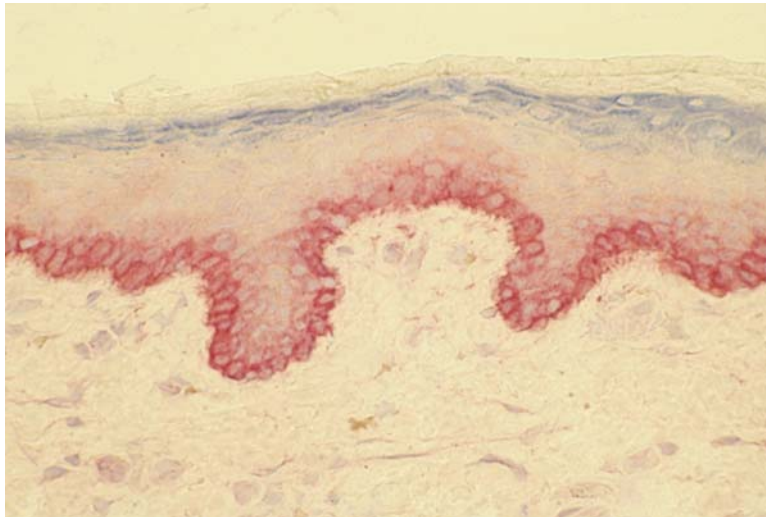


Abbildung 4-12: Laminin α3, Lidhaut, 25x

Diffuse Verteilung im Hautepithel mit Betonung der basalen Epithelschichten und der BMZ; Gefäße negativ

4.4. Unterschiede zwischen gesunder Bindehaut und Bindehaut bei Glaukom

Antigen	gesunde Bindehaut			BH bei Glaukom		
	Epithel	BMZ	Gefäße	Epithel	BMZ	Gefäße
Laminin α	∅	+	+	∅	+	+
Laminin α1	+	n.a.	+	+	n.a.	+
Laminin α2	∅/+	∅/+	∅/+	∅	∅	∅/+
Laminin α3	+	n.a.	∅	+	n.a.	∅
Laminin β1	∅ (∅ : 35/41 = 85%)	∅ (∅ : 35/41 = 85%)	∅/+	+ (10/16 = 62,5%)	n.a. (10/16 = 62,5%)	∅/+
Laminin β3	∅	∅	∅	∅	∅	∅
Laminin γ1	+	n.a.	+	+	+	+
Laminin γ2	∅/+ (∅ : 27/41 = 66%)	∅/+ (∅ : 27/41 = 66%)	∅	+ (11/16 = 69%)	n.a. (11/16 = 69%)	∅
Laminin γ3	∅	∅	∅	∅	∅	∅
Kalinin	∅	+	∅	∅	+	∅
β4-Integrin	+	n.a.	+	+	n.a.	+
Kollagen IV	∅	+	+	∅	+	+
Kollagen VII	+	n.a.	∅	+	n.a.	∅

Tabelle 4-4: Gegenüberstellung der Färbeergebnisse von gesunder Bindehaut (Tabelle 4-1) und Bindehaut bei Glaukom (Tabelle 4-2)

+ Färbung; ∅ keine Färbung; ∅/+ Färbung variabel, jedoch überwiegend negativ; n.a. nicht abgrenzbar; **signifikante Unterschiede zwischen gesunder Bindehaut und Bindehaut bei Glaukom;** in Klammern Angabe des Färbeergebnis in Fallzahl und Prozent

Das Epithel und die BMZ der gesunden Bindehäute waren überwiegend negativ für Laminin $\beta 1$ (85%, Abbildung 4-13). Laminin $\gamma 2$ zeigte dort eine variable Anfärbung, die jedoch größtenteils negativ ausfiel (66%) und weder geschlechts- noch altersabhängig war.

Das Epithel und die BMZ der Bindehäute bei Glaukom färbten sich zum signifikant höherem Teil positiv für Laminin $\beta 1$ (62,5%, $p = 0,001$, Abbildung 4-14) und Laminin $\gamma 2$ (69%, $p = 0,018$).

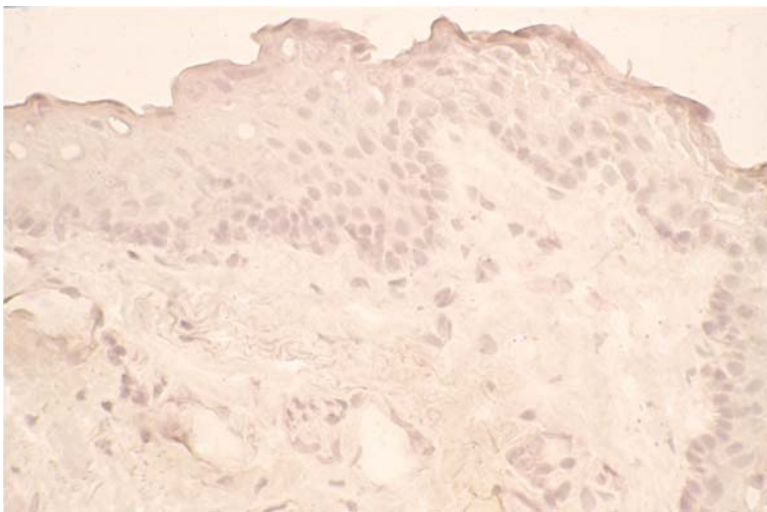


Abbildung 4-13: Laminin $\beta 1$, gesunde Bindehaut, 25x

Epithel, BMZ und Gefäße negativ

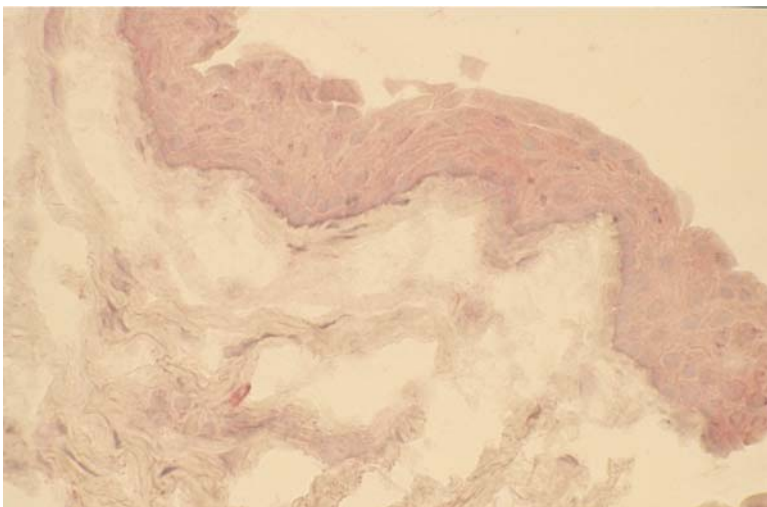


Abbildung 4-14: Laminin $\beta 1$, Bindehaut bei Glaukom, 25x

Positive Reaktion im Bindehautepithel mit zarter Abgrenzung der BMZ

4.5. Unterschiede zwischen Binde- und Lidhaut

Antigen	Bindehaut			Lidhaut		
	Epithel	BMZ	Gefäße	Epithel	BMZ	Gefäße
Laminin α	Ø	+	+	Ø	+	+
Laminin $\alpha 1$	+	n.a.	+	+	+	+
Laminin $\alpha 2$	Ø/+	Ø/+	Ø/+	+	n.a.	+
Laminin $\alpha 3$	+	n.a.	Ø	+	n.a.	Ø
Laminin $\beta 1$	Ø/+	Ø/+	Ø/+	+	n.a.	+
Laminin $\beta 3$	Ø	Ø	Ø	+	+	Ø
Laminin $\gamma 1$	+	n.a.	+	+	n.a.	+
Laminin $\gamma 2$	Ø/+	Ø/+	Ø	Ø	+	Ø
Laminin $\gamma 3$	Ø	Ø	Ø	+	n.a.	+
Kalinin	Ø	+	Ø	Ø	+	Ø
$\beta 4$ -Integrin	+	n.a.	+	+	+	+
Kollagen IV	Ø	+	+	Ø	+	+
Kollagen VII	+	n.a.	Ø	+	n.a.	Ø

Tabelle 4-5: Gegenüberstellung der Färbeergebnisse von Binde- (Tabelle 4-1 und Tabelle 4-2) und Lidhaut (Tabelle 4-3)

+ Färbung; Ø keine Färbung; Ø/+ Färbung variabel, jedoch überwiegend negativ; n.a. nicht abgrenzbar; **Unterschiede zwischen Binde- und Lidhaut**

Die BMZ der Lidhaut färbte sich positiv für Laminin $\beta 3$ und $\gamma 2$ mit Beteiligung des Epithels bei Laminin $\beta 3$ (Abbildung 4-15). Die Verteilung von Laminin $\alpha 2$, $\beta 1$ und $\gamma 3$ war diffus im Hautepithel mit Betonung der basalen Epithelschichten und der BMZ zu sehen (Abbildung 4-16).

Das Epithel und die BMZ der Bindehäute zeigte im Gegensatz zur Lidhaut größtenteils keine Färbung für Laminin $\beta 3$ (Abbildung 4-8) und $\gamma 3$ (Abbildung 4-3). Laminin $\alpha 2$, $\beta 1$ und $\gamma 2$ färbte sich in der BMZ der Bindehäute variabel an, jedoch fiel das Ergebnis überwiegend negativ aus (Abbildung 4-13).

Die Gefäße der Bindehaut waren im Vergleich zu den Gefäßen der Lidhaut größtenteils negativ für Laminin $\alpha 2$, $\beta 1$ und $\gamma 3$ (Abbildung 4-3 und Abbildung 4-16).

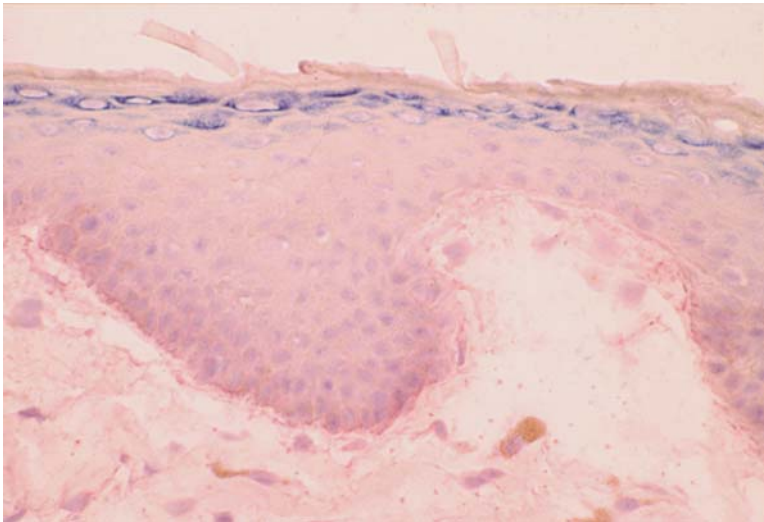


Abbildung 4-15: Laminin β 3, Lidhaut, 25x

Positive Reaktion im Hautepithel mit abgrenzbarer BMZ

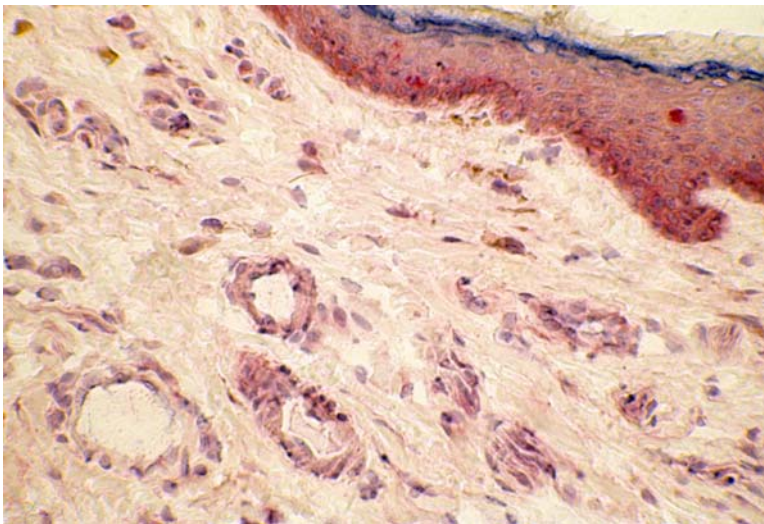


Abbildung 4-16: Laminin γ 3, Lidhaut, 20x

Diffuse Verteilung im Hautepithel mit Betonung der basalen Epithelschichten und der BMZ; Gefäße positiv

5. Diskussion

5.1. Immunhistochemische Untersuchung der Basalmembranen

Laminine sind kreuzförmige, heterotrimere Glykoproteine, bestehend aus einer α -, β - und γ -Kette. Sie sind wichtigster nicht-kollagener Bestandteil von Basalmembranen und beeinflussen Wachstum, Differenzierung, Migration, Adhäsion und Polarisation von Zellen [21;55;65;69]. Die Laminin-Ketten $\alpha 5$, $\beta 1$ und $\gamma 1$ kommen nahezu ubiquitär in Basalmembranen vor, wohingegen andere Ketten ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\gamma 2$, $\gamma 3$) selektiv auftreten und dadurch die gewebe-spezifische Variabilität der Basalmembranstruktur und -funktion mitbestimmen [21;24;32;56].

Laminin-Ketten können Basalmembran-unabhängig auf Epitheloberflächen und um stromale Hornhautzellen (Keratozyten) nachgewiesen werden [56;66]. So ist die $\gamma 3$ -Kette an der apikalen Seite von Flimmerepithelien zu finden, was wichtig für die Morphogenese und Stabilität dieser Zellen zu sein scheint [56]. *Ljubimov et al.* wies eine zarte und variable Anfärbung von Laminin $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ und $\gamma 1$ um Keratozyten nach [66]. In dieser Arbeit färbten die Antikörper gegen Laminin $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 1$, $\gamma 1$ und $\gamma 3$ gewebeabhängig nicht die Basalmembran allein, sondern die basalen Epithelzellen mit an. Da es keine unspezifische Farbreaktion an anderen Stellen des Gewebes gab, spricht die Anfärbung des basalen Epithels für ein Vorkommen der Laminin-Ketten in diesen Regionen.

Gefäße weisen je nach Art und Funktion unterschiedliche Laminine in ihrer Basalmembran auf [21;24;31;45]. Die endotheliale Laminin-Expression hängt ferner vom Entwicklungsstadium, von Hormonen und Entzündungsmediatoren ab [45]. *Ljubimov et al.* [66] konnte Laminin $\alpha 2$ um Bindehautgefäße nachweisen, während dies *Tuori et al.* [119] nicht möglich war. Die variable Anfärbung von Laminin $\alpha 2$ und $\beta 1$ um Bindehautgefäße in der vorliegenden Arbeit könnten durch diese Erkenntnisse erklärt werden.

Fine [34] und *Tidman et al.* [113] berichten über alters- und geschlechtsabhängige ultrastrukturelle Unterschiede in der dermoepidermalen Grenzzone. Variationen im Vorkommen einzelner Basalmembrankomponenten in der Bindehaut wurden in diesem Zusammenhang bislang nicht untersucht. Die immunhistochemische Analyse der BMZ der Bindehaut zeigte in dieser Arbeit weder einen alters- noch geschlechtsspezifischen Unterschied im Verteilungsmuster der Laminine, des $\beta 4$ -Integrins, Kalinins, Kollagens IV oder VII.

Die Bindehaut wies im Vergleich zur Lidhaut deutliche Unterschiede im Verteilungsmuster der Basalmembrankomponenten auf: Laminin $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 3$, $\gamma 2$ und $\gamma 3$ konnten in der Lidhaut, aber größtenteils nicht in den Bindehautbiopsien gefunden werden. Während alle Ketten des Laminin-5 ($\alpha 3\beta 3\gamma 2$) in der Lidhaut sichtbar waren, konnte nur die $\alpha 3$ -Kette in allen gesunden Bindehäuten nachgewiesen werden.

Die Anwesenheit von Laminin $\alpha 2$ in der konjunktivalen BMZ wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Während *Ljubimov et al.* [66] dieses Glykoprotein in der BMZ von Limbus und Konjunktiva nachweisen konnte, war dies *Tuori et al.* [119] nur am Limbus, nicht aber in der übrigen Bindehaut möglich. Laminin $\beta 1$ und $\beta 3$ zeigten sich bei beiden Autoren in der BMZ gesunder Bindehaut nahe dem Limbus von post-mortem entnommenen sklerokornealen Ringen. *Dietlein et al.* [28] wies Laminin $\gamma 2$ am Limbus nach, Untersuchungen an der Bindehaut fehlen.

Die Unterschiede der Ergebnisse dieser Arbeit im Vergleich zur Literatur lassen sich möglicherweise durch die Anzahl der Fälle und durch die verschiedenen Methoden der Probengewinnung und -verarbeitung erklären. Während *Ljubimov et al.* [66] und *Tuori et al.* [119] kleine Fallzahlen (*Ljubimov* 6, *Tuori* 8 Fälle) von post-mortem gewonnenen Gewebeproben nahe dem Limbus mittels Immunfluoreszenz-Methode untersuchten, wurden die Bindehautbiopsien dieser Studie in vivo im rücksichtsvollen Abstand zum Limbus gewonnen, sofort weiterverarbeitet und mittels APAAP-Methode gefärbt. Erfahrungsberichte haben gezeigt, dass einige Antigene mit der APAAP-Methode eindeutiger detektierbar sind als mit der Immunfluoreszenz-Methode [104;108]. Da die Antikörper gegen Laminin $\alpha 2$, $\beta 1$,

$\beta 3$ und $\gamma 2$ ein zufrieden stellendes Färbeergebnis an der BMZ der Lidhaut lieferten, ist ein technisches Problem unwahrscheinlich.

Interessanterweise war Laminin $\beta 1$ ($p = 0,001$) und $\gamma 2$ ($p = 0,018$) in den Bindehäuten der Glaukumpatienten zu einem signifikant höherem Teil positiv. Zwei Gründe könnten für dieses Ergebnis verantwortlich sein: Die Bindehautbiopsien mit positivem Nachweis für Laminin $\beta 1$ und $\gamma 2$ wurden im Rahmen der Glaukomoperationen näher am Limbus entnommen als die übrigen Biopsien. Dies würde mit den Resultaten von *Dietlein et al.* [28] übereinstimmen, der Laminin $\beta 1$ und $\gamma 2$ in der BMZ des Limbus nachweisen konnte. So würde die These unterstützt werden, dass Laminin $\beta 1$ und $\gamma 2$ tatsächlich nur am Limbus nachweisbar sind und nicht anderweitig in der Konjunktiva vorkommen. Zum Zweiten könnte die Anwesenheit von Laminin $\beta 1$ und $\gamma 2$ einen realen Unterschied darstellen, verursacht durch das Glaukom selbst, durch die antiglaukomatöse Therapie oder durch die in Augentropfen enthaltenen Konservierungsmittel.

Die Abwesenheit von Laminin $\beta 3$ und $\gamma 2$ in der BMZ der Mehrzahl der gesunden Bindehäute und ihre Anwesenheit in der Lidhaut ist besonders interessant, da diese Ketten zusammen mit Laminin $\alpha 3$ Laminin-5 (Epiligrin, Kalinin, Nicein, BM600) formatieren. Die $\alpha 3$ -Kette des Laminin-5 wird als Hauptzielantigen bei Epiligrin-assoziierten, Schleimhautpemphigoid-ähnlichen Erkrankungen angesehen [52]. Daneben wurden IgG-Autoantikörper gegen die β - und γ -Kette von Laminin-5 beschrieben, teilweise mit Kreuzreaktivität zu Laminin $\alpha 3$ [25;40;51;62]. Im Gegensatz zum generalisierten Schleimhautpemphigoid entwickeln Patienten mit rein okulärem Pemphigoid selten Autoantikörper gegen Laminin-5 [23]. Diese klinische Beobachtung könnte durch die virtuelle Abwesenheit von $\beta 3$ - und $\gamma 2$ -Ketten in der normalen Konjunktiva erklärt werden.

Eine andere interessante Entdeckung war, dass Laminin $\beta 1$ in der Lidhaut und im basalen Epithel der meisten Bindehäute der Glaukumpatienten vorkam, größtenteils aber nicht in der BMZ der gesunden Bindehautproben nachweisbar war. Die $\beta 1$ -Kette ist Teil von Laminin-6, ein Protein, das ebenfalls als potentiell Antigen beim Schleimhautpemphigoid diskutiert wird [19], aber selten – wenn überhaupt – an der rein okulären Form beteiligt ist. Die Häufigkeit von Autoantikörpern gegen Laminin-6 beim Pseudopemphigoid ist unbekannt.

Integrine sind heterodimere Moleküle, bestehend aus einer α - und β -Untereinheit. Sie sind Bestandteile von Hemidesmosomen und spielen als Zelladhäsionsrezeptoren eine entscheidende Rolle bei der Organisation und Funktion von Epithelien [95]. Neben der Wundheilung [59] sind sie an der Progression und Metastasierung von Tumoren beteiligt [95;130]. $\alpha 6\beta 4$ -Integrin ist ein Lamininbindender, transmembraner Rezeptor, der Zellsignale weiterleitet, die über Hemidesmosomen vermittelt sind [109].

Autoantikörper gegen $\beta 4$ -Integrin werden oft in Seren von Patienten mit okulärem Schleimhautpemphigoid gefunden [9;20;58;120]. Die Bindung dieser Autoantikörper an IC3.4, eine intrazelluläre Domäne des humanen $\beta 4$ -Moleküls, könnte eine Instabilität der Hemidesmosomen verursachen und die Blasenbildung mit Vernarbung der Bindehaut erklären [58]. In Übereinstimmung mit diesen Erkenntnissen fanden wir $\beta 4$ -Integrin in der BMZ aller unserer Bindehautbiopsien, die der Glaukumpatienten mit eingeschlossen.

5.2. Assoziation von Glaukom und Schleimhautpemphigoid

Das Schleimhautpemphigoid (engl. mucous membrane pemphigoid, MMP) ist eine seltene, vernarbende, autoimmune Haut- und Schleimhauterkrankung mit einer geschätzten Prävalenz von 1/15.000 bis 1/40.000 in der allgemeinen Bevölkerung [3;37]. Etwa 70% der Patienten weisen eine okuläre Beteiligung auf, ein Drittel davon als Erstmanifestation [26;37;39]. Schleimhautpemphigoid-Patienten ohne okuläre Erkrankung haben in den ersten fünf Jahren ein Risiko von etwa 5% pro Jahr eine solche zu entwickeln (kumulatives Risiko nach fünf Jahren = 22%) [112].

Die Prävalenz des Glaukoms beträgt 1–2% in der Gesamtbevölkerung und liegt bei schätzungsweise 2,8–14,3% in der Altersgruppe der Patienten mit Schleimhautpemphigoid [43;111]. Da die Diagnostik des Glaukoms bei Schleimhautpemphigoid-Patienten durch Hornhautveränderungen erschwert ist, ist die Dunkelziffer nach neueren Studien bei 26–28% zu vermuten [72;111]. Ebenso schwierig ist die Bestimmung der Prävalenz des Schleimhautpemphigoids unter Glaukompatienten, da die Frühstadien dieser Erkrankung (chronische Konjunktivitis, subepitheliale Fibrosierung) oft nicht erkannt werden.

Die Ursache der Assoziation von Glaukom und Schleimhautpemphigoid ist bis heute nicht abschließend geklärt. Mehrfach wurde die Entität des medikamenteninduzierten Pemphigoids (engl. drug-induced cicatricial pemphigoid, DICC) beschrieben [47;61;83;88;125]. So kann die orale Einnahme von β -Blockern (Practolol) in Einzelfällen zur Fibrosierung der Konjunktiva, des Peritoneums oder der Pleura führen [125]. Weitaus häufiger wird die Entwicklung eines okulären Pemphigoids bei langfristig angewendeten Ophthalmika beobachtet und manifestiert sich bei einseitiger Applikation meist unilateral [47;61;88]. Wirkstoffe, die in diesem Zusammenhang erwähnt werden, sind topisches Idoxuridin (Virustatikum) [61] sowie die lokalen Antiglaukomatosa Echothiophat Iodid, Pilocarpin, Epinephrin, Dipivefrin, Guanethidin und Timolol [35;47;83;88;91;93].

Glaukompatienten sind besonders betroffen, da die lokale Therapie in der Regel dauerhaft ist. Im Laufe der Behandlung werden die Wirkstoffe meist gewechselt oder in Kombinationen gegeben. Es ist daher schwierig zu beurteilen, ob bestimmte Antiglaukomatosa eher zu Bindehautveränderungen führen als andere. Das Risiko für entzündliche Prozesse steigt mit der Anzahl der verwendeten Präparate und der Therapiedauer [4;11]. Die lokale Therapie der in dieser Arbeit untersuchten Glaukompatienten bestand zu Beginn überwiegend aus dem β -Blocker Timolol, der im Verlauf meist mit Carboanhydrasehemmern und Prostaglandin-Derivaten kombiniert wurde. Die Therapiedauer betrug im Mittel 9,7 Jahre. Es konnte keine Korrelation zwischen den Wirkstoffen und den Veränderungen an der BMZ festgestellt werden.

Die genauen Mechanismen, die in der Bindehaut zur Auslösung der vernarbenden Prozesse führen, sind unklar. Da verschiedene Arzneimittel nach lokaler Applikation zum gleichen Krankheitsbild führen, scheinen unspezifische Oberflächenschäden durch den Wirkstoff oder andere Inhaltsstoffe (Konservierungsmittel) eine Rolle zu spielen [91]. Bindehautbiopsien von Glaukompatienten zeigen nach langjähriger lokaler Medikamentengabe eine deutlich reduzierte Becherzellichte, squamöse Metaplasien, eine Zunahme Fibroblasten-ähnlicher Zellen sowie ein entzündliches, mononukleäres Zellinfiltrat im Vergleich zu Patienten ohne topischer Medikation [4;5;11;73;80;105]. Langzeitstudien belegen, dass unabhängig von der verwendeten Medikation eine signifikante Fornixverkürzung eintritt [103].

Konservierungsmittel wirken allergogen und können zu chronischen Reizzuständen führen, die möglicherweise eine Vernarbung begünstigen. An Rattenaugen konnten entzündliche Infiltrate und toxische histopathologische Veränderungen nach Konservierungsmittlexposition (Benzalkoniumchlorid) nachgewiesen werden [5]. Benzalkoniumchlorid wird ferner als Hauptfaktor für konjunktivale Metaplasien angesehen [80]. Untersuchungen an kultivierten Bindehaut- und Trabekelwerkzellen haben gezeigt, dass Konservierungsstoffe die Bildung freier Sauerstoffradikale erhöhen [44;122]. Der oxidative Stress bewirkt in vitro eine vermehrte Synthese extrazellulärer Matrixproteine, die Reduktion von Matrix-abbauenden Enzymen (Metalloproteinasen), eine schnellere Zellalterung

und den vermehrten Zelltod [122]. Diese Pathomechanismen sind an den glaukomtypischen Veränderungen im Trabekelwerk von POWG-Patienten beteiligt, könnten möglicherweise aber auch die konjunktivale Fibrosierung begünstigen.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich Bindehautbiopsien von Glaukompatienten untersucht, die zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme keine fibrotischen Veränderungen aufwiesen. Die festgestellten Unterschiede im Vorkommen von Laminin-Ketten könnten durch topische, antiglaukomatöse Medikamente (Wirkstoff oder Konservierungsmittel) induziert sein und das Risiko für vernarbende Erkrankungen, wie das Schleimhautpemphigoid, erhöhen.

Beweisend für das Vorliegen eines Schleimhautpemphigoids ist der Nachweis von Immunablagerungen entlang der epithelialen BMZ, bestehend aus IgG, IgA und Komplementfaktor C3 [17;36;37;91;112]. Interessanterweise zeigt die histologische, immunhistochemische und elektronenmikroskopische Aufarbeitung von Bindehaut-Biopsien keinen Unterschied zwischen Patienten mit Schleimhaut- und Pseudopemphigoid [7;37;64;93]. In der retrospektiven Studie von *Tauber et al.* wiesen 21% der Patienten mit Schleimhautpemphigoid und Glaukom eine extraokuläre Manifestation der Erkrankung mit Nachweis von immunoreaktivem Material entlang der BMZ auf [111]. Ebenso wurden Fälle beschrieben, bei denen das Absetzen der Medikamente nicht zu einer Regression der Gewebevernarbung führten [61]. Diese Beobachtungen sprechen für das Vorliegen einer systemischen Autoimmunerkrankung, möglicherweise ausgelöst durch medikamentenbedingte Veränderungen an der BMZ, die zu einem "epitope-spreading" führen. Hierunter versteht man das Demaskieren von immunogenen Strukturen durch vorangegangene entzündliche Prozesse – ein Pathomechanismus der beim Schleimhautpemphigoid bekannt ist [17]. Die in dieser Arbeit nachgewiesenen Veränderungen an der BMZ von Glaukompatienten könnten durch die lokale Therapie verursacht sein und ein "epitope-spreading" mit nachfolgender Immunreaktion begünstigen. Bis heute ist unklar, ob die Entität des Pseudopemphigoids wirklich existiert, oder ob es sich um Patienten mit Schleimhautpemphigoid handelt, deren Erkrankung durch Medikamente induziert bzw. exazerbiert wurde [72].

Die Assoziation von Glaukom und Schleimhautpemphigoid kann einerseits bei chronischer Medikamentenapplikation im Sinne des Pseudopemphigoids erklärt werden. Andererseits besteht beim okulären Pemphigoid eine Prädisposition zur intraokularen Drucksteigerung. Als Grund hierfür wird die Obstruktion des Kammerwasserabflusses durch Narbenbildungen vermutet [111]. Da das Schleimhautpemphigoid in frühen Stadien oft nicht erkannt wird, besteht die Möglichkeit, dass häufiger als bisher vermutet diese Erkrankung einem neu diagnostizierten Glaukom zugrunde liegt. Die chronische Medikamentengabe könnte die vernarbenden Prozesse aggravieren. Immunhistochemische Untersuchungen an Bindehautproben von Glaukumpatienten vor Therapiebeginn wären notwendig, um diese These zu untermauern.

6. Zusammenfassung

Das Schleimhautpemphigoid (frühere Bezeichnung vernarbendes Pemphigoid) ist eine seltene, chronisch entzündliche Autoimmunerkrankung der Basalmembranzone (BMZ), die mit subepidermaler Blasenbildung und Vernarbung der Haut und Schleimhäute einhergeht. Als Modell für den Aufbau der BMZ wird üblicherweise die Haut herangezogen, ohne Rücksicht auf mögliche Unterschiede zwischen Haut und Bindehaut. Diese könnten beim okulären Schleimhautpemphigoid zur Erklärung der variablen Gewebeteilung beitragen.

Das Schleimhautpemphigoid tritt gehäuft in Assoziation mit dem Glaukom auf. Dabei ist nicht bekannt, ob es im Rahmen des Glaukoms/der antiglaukomatösen Therapie zur Änderung der Antigenverteilung in der BMZ kommt und dadurch die Entwicklung des Schleimhautpemphigoids begünstigt wird.

Es wurden 41 Biopsien von Bindehaut-Gesunden verschiedenen Alters (15–92 Jahre) sowie 16 Bindehautbiopsien von Glaukom-Patienten (10–90 Jahre) unter topischer antiglaukomatöser Therapie immunhistochemisch untersucht und mit dem Antigenverteilungsmuster in normaler Lidhaut verglichen. Dabei kamen Antikörper gegen folgende Basalmembrankomponenten zur Anwendung: Laminin α , $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 1$, $\beta 3$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, Kalinin, $\beta 4$ -Integrin, Kollagen IV und VII.

Das Biopsiematerial wurde bei -60°C schnellgefroren und Gefrierschnitte von 8 μm Dicke angefertigt. Die Präparate wurden 15 Min. in eiskaltem Aceton ($0-4^{\circ}\text{C}$) fixiert, 30 Min. mit dem Primärantikörper bei Raumtemperatur inkubiert, nach der APAAP-Methode gefärbt, 1–2 Min. mit Hämalaun gegengefärbt und in Kaisers Glyceringelatine eingebettet.

Bewertet wurde das Vorhandensein einer immunreaktiven Färbung von Epithel, BMZ und Gefäßen. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von Kreuztabellen.

Die immunhistochemische Analyse der BMZ der Bindehaut zeigte in dieser Arbeit weder einen alters- noch geschlechtsspezifischen Unterschied im Verteilungsmuster der Laminine, des $\beta 4$ -Integrins, Kalinins, Kollagens IV oder VII.

Die BMZ der Lidhaut färbte sich positiv für Laminin α , $\alpha 1$, $\beta 3$, $\gamma 2$, Kalinin, $\beta 4$ -Integrin und Kollagen IV. Die Verteilung von Laminin $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 1$, $\gamma 1$, $\gamma 3$ und Kollagen VII war diffus im Hautepithel mit Betonung der basalen Epithelschichten und der BMZ zu sehen.

Das Epithel und die BMZ der Bindehaut zeigten im Gegensatz zur Lidhaut keine Färbung für Laminin $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 3$, $\gamma 2$ und $\gamma 3$ im überwiegenden Teil der Fälle. Die Gefäße der Bindehaut waren im Vergleich zu den Gefäßen der Lidhaut größtenteils negativ für Laminin $\alpha 2$, $\beta 1$ und $\gamma 3$.

Das Epithel und die BMZ der Bindehäute bei Glaukom färbten sich zum signifikant höherem Teil positiv für Laminin $\beta 1$ (62,5%, $p = 0,001$) und Laminin $\gamma 2$ (69%, $p = 0,018$).

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit charakteristische Unterschiede in der Antigenität der BMZ von normaler Haut, gesunder Bindehaut und Bindehaut bei Glaukompatienten gefunden werden, insbesondere im Vorkommen von Laminin-Ketten. Diese Unterschiede könnten die variable Beteiligung von Haut und Augen bei Erkrankungen der BMZ, wie dem Schleimhautpemphigoid, erklären. Variationen der Laminin-Ketten in der konjunktivalen BMZ von Glaukompatienten könnten durch topische, antiglaukomatöse Medikamente (Wirkstoff oder Konservierungsmittel) induziert sein und das Risiko für die Entwicklung eines Pseudopemphigoids erhöhen.

7. Literaturverzeichnis

1. Abrahamson DR: Recent studies on the structure and pathology of basement membranes. *J.Pathol.* 1986;149:257-278.
2. Ahmed AR, Foster S, Zaltas M, Notani G, Awdeh Z, Alper CA, Yunis EJ: Association of DQw7 (DQB1*0301) with ocular cicatricial pemphigoid. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1991;88:11579-11582.
3. Ahmed AR, Kurgis BS, Rogers RS, III: Cicatricial pemphigoid. *J Am.Acad.Dermatol.* 1991;24:987-1001.
4. Ariturk N, Oge I, Baris S, Erkan D, Sullu Y, Koc F: The effects of antiglaucomatous agents on conjunctiva used for various durations. *Int.Ophthalmol.* 1996;20:57-62.
5. Baudouin C, Pisella PJ, Fillacier K, Goldschild M, Becquet F, De Saint JM, Bechettille A: Ocular surface inflammatory changes induced by topical antiglaucoma drugs: human and animal studies. *Ophthalmology* 1999;106:556-563.
6. Bedane C, McMillan JR, Balding SD, Bernard P, Prost C, Bonnetblanc JM, Diaz LA, Eady RA, Giudice GJ: Bullous pemphigoid and cicatricial pemphigoid autoantibodies react with ultrastructurally separable epitopes on the BP180 ectodomain: evidence that BP180 spans the lamina lucida. *J Invest Dermatol.* 1997;108:901-907.
7. Bhol K, Mohimen A, Neumann R, Yunis J, Foster S, Yunis EJ, Ahmed AR: Differences in the anti-basement membrane zone antibodies in ocular and pseudo-ocular cicatricial pemphigoid. *Curr.Eye Res.* 1996;15:521-532.
8. Bhol K, Udell I, Haider N, Yunis JJ, Mohimen A, Neuman R, Grasso C, Ahmed AR, Foster S: Ocular cicatricial pemphigoid. A case report of monozygotic twins discordant for the disease. *Arch.Ophthalmol.* 1995;113:202-207.

9. Bhol KC, Dans MJ, Simmons RK, Foster CS, Giancotti FG, Ahmed AR: The autoantibodies to alpha 6 beta 4 integrin of patients affected by ocular cicatricial pemphigoid recognize predominantly epitopes within the large cytoplasmic domain of human beta 4. *J Immunol.* 2000;165:2824-2829.
10. Bhol KC, Goss L, Kumari S, Colon JE, Ahmed AR: Autoantibodies to human alpha6 integrin in patients with oral pemphigoid. *J Dent.Res.* 2001;80:1711-1715.
11. Broadway DC, Grierson I, O'Brien C, Hitchings RA: Adverse effects of topical antiglaucoma medication. I. The conjunctival cell profile. *Arch.Ophthalmol.* 1994;112:1437-1445.
12. Bron AJ, Tripathi RC, Tripathi BJ: Wolff's anatomy of the eye and orbit, ed 8. London, New York, Chapman & Hall Medical, 1997.
13. Brydak-Godowska J, Moneta-Wielgos J, Pauk-Domanska M, Drobecka-Brydak E, Samsel A, Kecik M, Kowalewski C, Mackiewicz W, Kecik D: [Diagnostics and pharmacological treatment of ocular cicatricial pemphigoid]. *Klin.Oczna* 2005;107:725-727.
14. Burgeson RE, Chiquet M, Deutzmann R, Ekblom P, Engel J, Kleinman H, Martin GR, Meneguzzi G, Paulsson M, Sanes J: A new nomenclature for the laminins. *Matrix Biol.* 1994;14:209-211.
15. Champlaud MF, Lunstrum GP, Rousselle P, Nishiyama T, Keene DR, Burgeson RE: Human amnion contains a novel laminin variant, laminin 7, which like laminin 6, covalently associates with laminin 5 to promote stable epithelial-stromal attachment. *J Cell Biol.* 1996;132:1189-1198.
16. Chan LS: Human skin basement membrane in health and in autoimmune diseases. *Front Biosci.* 1997;2:d343-d352.
17. Chan LS: Mucous membrane pemphigoid. *Clin.Dermatol.* 2001;19:703-711.
18. Chan LS, Hammerberg C, Cooper KD: Significantly increased occurrence of HLA-DQB1*0301 allele in patients with ocular cicatricial pemphigoid. *J Invest Dermatol.* 1997;108:129-132.

19. Chan LS, Majmudar AA, Tran HH, Meier F, Schaumburg-Lever G, Chen M, Anhalt G, Woodley DT, Marinkovich MP: Laminin-6 and laminin-5 are recognized by autoantibodies in a subset of cicatricial pemphigoid. *J Invest Dermatol.* 1997;108:848-853.
20. Chan RY, Bhol K, Tesavibul N, Letko E, Simmons RK, Foster CS, Ahmed AR: The role of antibody to human beta4 integrin in conjunctival basement membrane separation: possible in vitro model for ocular cicatricial pemphigoid. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 1999;40:2283-2290.
21. Colognato H, Yurchenco PD: Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev.Dyn.* 2000;218:213-234.
22. Cooper AR, Kurkinen M, Taylor A, Hogan BL: Studies on the biosynthesis of laminin by murine parietal endoderm cells. *Eur.J Biochem.* 1981;119:189-197.
23. Coronella G, Amato L, Berti S, Moretti S, Terracina M, Mastrogiacomo A, Fabbri P: Ocular 'non-scarring' mucous membrane pemphigoid associated with anti-laminin-5 antibodies. *Clin.Exp.Dermatol.* 2005;30:679-681.
24. Cotrufo M, De Santo L, Della CA, Di Meglio F, Guerra G, Quarto C, Vitale S, Castaldo C, Montagnani S: Basal lamina structural alterations in human asymmetric aneurismatic aorta. *Eur.J.Histochem.* 2005;49:363-370.
25. Dainichi T, Takeshita H, Moroi Y, Urabe K, Yoshida M, Hisamatsu Y, Komai A, Duan H, Koga T, Hashimoto T, Furue M: Cicatricial pemphigoid with autoantibodies against the laminin 5 gamma 2 subunit. *Eur.J.Dermatol.* 2005;15:189-193.
26. Dayan S, Simmons RK, Ahmed AR: Contemporary issues in the diagnosis of oral pemphigoid: a selective review of the literature. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol.Endod.* 1999;88:424-430.
27. Deutzmann R, Aumailley M, Wiedemann H, Pysny W, Timpl R, Edgar D: Cell adhesion, spreading and neurite stimulation by laminin fragment E8 depends on maintenance of secondary and tertiary structure in its rod and globular domain. *Eur.J Biochem.* 1990;191:513-522.

28. Dietlein TS, Jacobi PC, Paulsson M, Smyth N, Krieglstein GK: [Variability of laminin isoforms in the limbus region of the eye]. *Klin.Monatsbl.Augenheilkd.* 1997;211:188-191.
29. Edgar D, Timpl R, Thoenen H: The heparin-binding domain of laminin is responsible for its effects on neurite outgrowth and neuronal survival. *EMBO J* 1984;3:1463-1468.
30. Egan CA, Lazarova Z, Darling TN, Yee C, Cote T, Yancey KB: Anti-epiligrin cicatricial pemphigoid and relative risk for cancer. *Lancet* 2001;357:1850-1851.
31. Ekblom M, Falk M, Salmivirta K, Durbeej M, Ekblom P: Laminin isoforms and epithelial development. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1998;857:194-211.
32. Ekblom P, Lonai P, Talts JF: Expression and biological role of laminin-1. *Matrix Biol.* 2003;22:35-47.
33. Engel J, Odermatt E, Engel A, Madri JA, Furthmayr H, Rohde H, Timpl R: Shapes, domain organizations and flexibility of laminin and fibronectin, two multifunctional proteins of the extracellular matrix. *J Mol.Biol.* 1981;150:97-120.
34. Fine JD: Structure and antigenicity of the skin basement membrane zone. *J Cutan.Pathol.* 1991;18:401-409.
35. Fiore PM, Jacobs IH, Goldberg DB: Drug-induced pemphigoid. A spectrum of diseases. *Arch.Ophthalmol.* 1987;105:1660-1663.
36. Fleming TE, Korman NJ: Cicatricial pemphigoid. *J Am.Acad.Dermatol.* 2000;43:571-591.
37. Foster CS: Cicatricial pemphigoid. *Trans.Am.Ophthalmol.Soc.* 1986;84:527-663.
38. Foster CS, Dutt JE, Rice BA, Kupferman AE, Lane L: Conjunctival epithelial basement membrane zone immunohistology: normal and inflamed conjunctiva. *Int.Ophthalmol.Clin.* 1994;34:209-214.

39. Foster CS, Wilson LA, Ekins MB: Immunosuppressive therapy for progressive ocular cicatricial pemphigoid. *Ophthalmology* 1982;89:340-353.
40. Fujimoto W, Toi Y, Okazaki F, Lazarova Z, Yancey KB, Arata J: Anti-epiligrin cicatricial pemphigoid with IgG autoantibodies to the beta and gamma subunits of laminin 5. *J Am.Acad.Dermatol.* 1999;40:637-639.
41. Fukuda K, Chikama T, Nakamura M, Nishida T: Differential distribution of subchains of the basement membrane components type IV collagen and laminin among the amniotic membrane, cornea, and conjunctiva. *Cornea* 1999;18:73-79.
42. Ghohestani RF, Nicolas JF, Rousselle P, Claudy AL: Identification of a 168-kDa mucosal antigen in a subset of patients with cicatricial pemphigoid. *J Invest Dermatol.* 1996;107:136-139.
43. Graham PA: Epidemiology of simple glaucoma and ocular hypertension. *Br.J Ophthalmol.* 1972;56:223-229.
44. Guenoun JM, Baudouin C, Rat P, Pauly A, Warnet JM, Brignole-Baudouin F: In vitro comparison of cytoprotective and antioxidative effects of latanoprost, travoprost, and bimatoprost on conjunctiva-derived epithelial cells. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 2005;46:4594-4599.
45. Hallmann R, Horn N, Selg M, Wendler O, Pausch F, Sorokin LM: Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol Rev.* 2005;85:979-1000.
46. Heickendorff L, Ledet T: Arterial basement-membrane-like material isolated and characterized from rabbit aortic myomedial cells in culture. *Biochem.J.* 1983;211:397-404.
47. Hirst LW, Werblin T, Novark M: Drug induced cicatrizing conjunctivitis simulating ocular pemphigoid. *Cornea* 1982;121-128.
48. Horiguchi Y, Ueda M, Shimizu H, Tanaka T, Matsuyoshi N, Utani A, Ikai K, Nishikawa T, Imamura S: An acquired bullous dermatosis due to an autoimmune reaction against uncein. *Br.J Dermatol.* 1996;134:934-938.

49. Hunter DD, Shah V, Merlie JP, Sanes JR: A laminin-like adhesive protein concentrated in the synaptic cleft of the neuromuscular junction. *Nature* 1989;338:229-234.
50. Junqueira LC, Carneiro J: *Histologie*, ed 4. Berlin, Springer-Verlag, 1996.
51. Kirtschig G, Caux F, McMillan JR, Bedane C, Aberdam D, Ortonne JP, Eady RA, Prost C: Acquired junctional epidermolysis bullosa associated with IgG autoantibodies to the beta subunit of laminin-5. *Br.J Dermatol.* 1998;138:125-130.
52. Kirtschig G, Marinkovich MP, Burgeson RE, Yancey KB: Anti-basement membrane autoantibodies in patients with anti-epiligrin cicatricial pemphigoid bind the alpha subunit of laminin 5. *J.Invest Dermatol.* 1995;105:543-548.
53. Kivirikko KI: Collagens and their abnormalities in a wide spectrum of diseases. *Ann.Med.* 1993;25:113-126.
54. Klein G, Langegger M, Timpl R, Ekblom P: Role of laminin A chain in the development of epithelial cell polarity. *Cell* 1988;55:331-341.
55. Kleinman HK, Cannon FB, Laurie GW, Hassell JR, Aumailley M, Terranova VP, Martin GR, DuBois-Dalcq M: Biological activities of laminin. *J Cell Biochem.* 1985;27:317-325.
56. Koch M, Olson PF, Albus A, Jin W, Hunter DD, Brunken WJ, Burgeson RE, Champlaud MF: Characterization and expression of the laminin gamma3 chain: a novel, non-basement membrane-associated, laminin chain. *J Cell Biol.* 1999;145:605-618.
57. Korman NJ: New and emerging therapies in the treatment of blistering diseases. *Dermatol.Clin.* 2000;18:127-12x.
58. Kumari S, Bhol KC, Simmons RK, Razzaque MS, Letko E, Foster CS, Razzaque AA: Identification of ocular cicatricial pemphigoid antibody binding site(s) in human beta4 integrin. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 2001;42:379-385.

59. Kurpakus MA, Quaranta V, Jones JC: Surface relocation of alpha 6 beta 4 integrins and assembly of hemidesmosomes in an in vitro model of wound healing. *J Cell Biol.* 1991;115:1737-1750.
60. Lang GK: *Augenheilkunde*, ed 2. Auflage. New York, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2000.
61. Lass JH, Thoft RA, Dohlman CH: Idoxuridine-induced conjunctival cicatrization. *Arch.Ophthalmol.* 1983;101:747-750.
62. Lazarova Z, Hsu R, Yee C, Yancey KB: Antiepiligrin cicatricial pemphigoid represents an autoimmune response to subunits present in laminin 5 (alpha3beta3gamma2). *Br.J Dermatol.* 1998;139:791-797.
63. Leivo I, Engvall E: Merosin, a protein specific for basement membranes of Schwann cells, striated muscle, and trophoblast, is expressed late in nerve and muscle development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1988;85:1544-1548.
64. Liesegang TJ: Conjunctival changes associated with glaucoma therapy: implications for the external disease consultant and the treatment of glaucoma. *Cornea* 1998;17:574-583.
65. Lin L, Daneshvar C, Kurpakus-Wheater M: Evidence for differential signaling in human conjunctival epithelial cells adherent to laminin isoforms. *Exp.Eye Res.* 2000;70:537-546.
66. Ljubimov AV, Burgeson RE, Butkowski RJ, Michael AF, Sun TT, Kenney MC: Human corneal basement membrane heterogeneity: topographical differences in the expression of type IV collagen and laminin isoforms. *Lab Invest* 1995;72:461-473.
67. Luke MC, Darling TN, Hsu R, Summers RM, Smith JA, Solomon BI, Thomas GR, Yancey KB: Mucosal morbidity in patients with epidermolysis bullosa acquisita. *Arch.Dermatol.* 1999;135:954-959.
68. Lunstrum GP, Sakai LY, Keene DR, Morris NP, Burgeson RE: Large complex globular domains of type VII procollagen contribute to the structure of anchoring fibrils. *J Biol.Chem.* 1986;261:9042-9048.

69. Malinda KM, Kleinman HK: The laminins. *Int.J Biochem.Cell Biol.* 1996;28:957-959.
70. Marinkovich MP: The molecular genetics of basement membrane diseases. *Arch.Dermatol.* 1993;129:1557-1565.
71. Masse M, Cserhalmi-Friedman PB, Falanga V, Celebi JT, Martinez-Mir A, Christiano AM: Identification of novel type VII collagen gene mutations resulting in severe recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Clin.Exp.Dermatol.* 2005;30:289-293.
72. Messmer EM, Hintschich CR, Partscht K, Messer G, Kampik A: [Ocular cicatricial pemphigoid. Retrospective analysis of risk factors and complications]. *Ophthalmologe* 2000;97:113-120.
73. Mondino BJ: Cicatricial pemphigoid and erythema multiforme. *Int.Ophthalmol.Clin.* 1983;23:63-79.
74. Mondino BJ, Brown SI: Ocular cicatricial pemphigoid. *Ophthalmology* 1981;88:95-100.
75. Moore JE, Shah S, Kumar V, Ainsworth JR, Page AB, McLean WH: Follow up of patients with ocular scarring secondary to LOC syndrome treated by amniotic membrane transplantation. *Br.J Ophthalmol.* 2005;89:939-941.
76. Murakami H, Nishioka S, Setterfield J, Bhogal BS, Black MM, Zillikens D, Yancey KB, Balding SD, Giudice GJ, Diaz LA, Nishikawa T, Kiyokawa C, Hashimoto T: Analysis of antigens targeted by circulating IgG and IgA autoantibodies in 50 patients with cicatricial pemphigoid. *J Dermatol.Sci.* 1998;17:39-44.
77. Mutasim DF, Pelc NJ, Anhalt GJ: Cicatricial pemphigoid. *Dermatol.Clin.* 1993;11:499-510.
78. Nagai N, Nakano K, Sado Y, Naito I, Gunduz M, Tsujigiwa H, Nagatsuka H, Ninomiya Y, Siar CH: Localization of type IV collagen $\alpha 1$ to $\alpha 6$ chains in basement membrane during mouse molar germ development. *Int.J Dev.Biol.* 2001;45:827-831.

79. Nayar M, Wojnarowska F, Venning V, Taylor CJ: Association of autoimmunity and cicatricial pemphigoid: is there an immunogenetic basis? *J Am.Acad.Dermatol.* 1991;25:1011-1015.
80. Nenciu A, Stefan C, Ardelean C: [Structural and immunohistochemical changes of conjunctiva induced by topical glaucoma medication]. *Oftalmologia* 2004;48:35-42.
81. Nerlich, A. Basalmembran und assoziierte Matrixproteine in normalem und pathologischem Gewebe. 1992. LMU München. Ref Type: Thesis/Dissertation
82. Nerlich A: [Morphology of basement membrane and associated matrix proteins in normal and pathological tissues]. *Veroff.Pathol.* 1995;145:1-139.
83. Norn MS: Pemphigoid related to epinephrine treatment. *Am.J Ophthalmol.* 1977;83:138.
84. Ortiz-Urda S, Garcia J, Green CL, Chen L, Lin Q, Veitch DP, Sakai LY, Lee H, Marinkovich MP, Khavari PA: Type VII collagen is required for Ras-driven human epidermal tumorigenesis. *Science* 2005;307:1773-1776.
85. Ott U, Odermatt E, Engel J, Furthmayr H, Timpl R: Protease resistance and conformation of laminin. *Eur.J Biochem.* 1982;123:63-72.
86. Palade G: Fine structure of blood capillaries. *J appl Phys* 1954;24:1424.
87. Pas HH, Kloosterhuis GJ, Heeres K, van der Meer JB, Jonkman MF: Bullous pemphigoid and linear IgA dermatosis sera recognize a similar 120-kDa keratinocyte collagenous glycoprotein with antigenic cross-reactivity to BP180. *J Invest Dermatol.* 1997;108:423-429.
88. Patten JT, Cavanagh HD, Allansmith MR: Induced ocular pseudopemphigoid. *Am.J Ophthalmol.* 1976;82:272-276.
89. Paulsson M: Basement membrane proteins: structure, assembly, and cellular interactions. *Crit Rev.Biochem.Mol.Biol.* 1992;27:93-127.

90. PEASE DC: Electron microscopy of the vascular bed of the kidney cortex. *Anat.Rec.* 1955;121:701-721.
91. Pleyer U, Muller B: [Ocular cicatricial pemphigoid]. *Ophthalmologe* 2001;98:584-597.
92. Podolnikova NP, Yakubenko VP, Volkov GL, Plow EF, Ugarova TP: Identification of a novel binding site for platelet integrins alpha IIb beta 3 (GPIIb/IIIa) and alpha 5 beta 1 in the gamma C-domain of fibrinogen. *J Biol.Chem.* 2003;278:32251-32258.
93. Pouliquen Y, Patey A, Foster CS, Goichot L, Savoldelli M: Drug-induced cicatricial pemphigoid affecting the conjunctiva. Light and electron microscopic features. *Ophthalmology* 1986;93:775-783.
94. Quigley HA: Number of people with glaucoma worldwide. *Br.J Ophthalmol.* 1996;80:389-393.
95. Rabinovitz I, Mercurio AM: The integrin alpha 6 beta 4 and the biology of carcinoma. *Biochem.Cell Biol.* 1996;74:811-821.
96. Rashid KA, Stern JN, Ahmed AR: Identification of an epitope within human integrin alpha 6 subunit for the binding of autoantibody and its role in basement membrane separation in oral pemphigoid. *J Immunol.* 2006;176:1968-1977.
97. Roat MI, Sossi G, Lo CY, Thoft RA: Hyperproliferation of conjunctival fibroblasts from patients with cicatricial pemphigoid. *Arch.Ophthalmol.* 1989;107:1064-1067.
98. Sakai LY, Keene DR, Morris NP, Burgeson RE: Type VII collagen is a major structural component of anchoring fibrils. *J Cell Biol.* 1986;103:1577-1586.
99. Sakashita S, Engvall E, Ruoslahti E: Basement membrane glycoprotein laminin binds to heparin. *FEBS Lett.* 1980;116:243-246.

100. Sarfarazi M, Child A, Stoilova D, Brice G, Desai T, Trifan OC, Poinoosawmy D, Crick RP: Localization of the fourth locus (GLC1E) for adult-onset primary open-angle glaucoma to the 10p15-p14 region. *Am.J Hum.Genet.* 1998;62:641-652.
101. Sasaki M, Kleinman HK, Huber H, Deutzmann R, Yamada Y: Laminin, a multidomain protein. The A chain has a unique globular domain and homology with the basement membrane proteoglycan and the laminin B chains. *J Biol.Chem.* 1988;263:16536-16544.
102. Schapers RF, Pauwels RP, Havenith MG, Smeets AW, van den Brandt PA, Bosman FT: Prognostic significance of type IV collagen and laminin immunoreactivity in urothelial carcinomas of the bladder. *Cancer* 1990;66:2583-2588.
103. Schwab IR, Linberg JV, Gioia VM, Benson WH, Chao GM: Foreshortening of the inferior conjunctival fornix associated with chronic glaucoma medications. *Ophthalmology* 1992;99:197-202.
104. Schwohl, A. Expression von Prostaglandin E2 in Entwicklungsstadien der Filarie *Onchocerca* sowie in Wirtszellen von Onchozerkosepatienten. 1-85. 2004. Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg. Ref Type: Thesis/Dissertation
105. Sherwood MB, Grierson I, Millar L, Hitchings RA: Long-term morphologic effects of antiglaucoma drugs on the conjunctiva and Tenon's capsule in glaucomatous patients. *Ophthalmology* 1989;96:327-335.
106. Smith EP, Taylor TB, Meyer LJ, Zone JJ: Identification of a basement membrane zone antigen reactive with circulating IgA antibody in ocular cicatricial pemphigoid. *J Invest Dermatol.* 1993;101:619-623.
107. Sonnenberg A, Linders CJ, Modderman PW, Damsky CH, Aumailley M, Timpl R: Integrin recognition of different cell-binding fragments of laminin (P1, E3, E8) and evidence that alpha 6 beta 1 but not alpha 6 beta 4 functions as a major receptor for fragment E8. *J Cell Biol.* 1990;110:2145-2155.

108. Stella-Holowiecka B, Jagoda K, Koehler M, Krzemien S, Holowiecki J:
[Comparison of clinical usefulness of immunophenotyping of leukemia using
the immunofluorescence and immunoenzyme APAAP methods]. *Acta*
Haematol.Pol. 1992;23:87-94.
109. Stepp MA, Spurr-Michaud S, Tisdale A, Elwell J, Gipson IK: Alpha 6 beta 4
integrin heterodimer is a component of hemidesmosomes.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1990;87:8970-8974.
110. Tauber J, Jabbur N, Foster CS: Improved detection of disease progression
in ocular cicatricial pemphigoid. *Cornea* 1992;11:446-451.
111. Tauber J, Melamed S, Foster CS: Glaucoma in patients with ocular
cicatricial pemphigoid. *Ophthalmology* 1989;96:33-37.
112. Thorne JE, Anhalt GJ, Jabs DA: Mucous membrane pemphigoid and
pseudopemphigoid. *Ophthalmology* 2004;111:45-52.
113. Tidman MJ, Eady RA: Ultrastructural morphometry of normal human
dermal-epidermal junction. The influence of age, sex, and body region on
laminar and nonlaminar components. *J.Invest Dermatol.* 1984;83:448-453.
114. Timpl R: Structure and biological activity of basement membrane proteins.
Eur.J.Biochem. 1989;180:487-502.
115. Timpl R: Macromolecular organization of basement membranes.
Curr.Opin.Cell Biol. 1996;8:618-624.
116. Timpl R, Aumailley M: Biochemistry of basement membranes.
Adv.Nephrol.Necker Hosp. 1989;18:59-76.
117. Timpl R, Brown JC: Supramolecular assembly of basement membranes.
Bioessays 1996;18:123-132.
118. Timpl R, Rohde H, Robey PG, Rennard SI, Foidart JM, Martin GR: Laminin-
-a glycoprotein from basement membranes. *J Biol.Chem.* 1979;254:9933-
9937.

119. Tuori A, Uusitalo H, Burgeson RE, Terttunen J, Virtanen I: The immunohistochemical composition of the human corneal basement membrane. *Cornea* 1996;15:286-294.
120. Tyagi S, Bhol K, Natarajan K, Livir-Rallatos C, Foster CS, Ahmed AR: Ocular cicatricial pemphigoid antigen: partial sequence and biochemical characterization. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1996;93:14714-14719.
121. Veit G, Kobbe B, Keene DR, Paulsson M, Koch M, Wagener R: Collagen XXVIII, a novel von Willebrand factor A domain-containing protein with many imperfections in the collagenous domain. *J Biol.Chem.* 2006;281:3494-3504.
122. Welge-Lüssen, U. Oxidativer Stress im Trabekelmaschenwerk/protektive Effekte moderner Antiglaukomatosa? Das Trabekelwerk im Fokus der Therapie, DOG-Glaukomsymposium Berlin 2006 19, 4-19. 2006. Berlin, Alcon. Ref Type: Magazine Article
123. Wetzels RH, Robben HC, Leigh IM, Schaafsma HE, Vooijs GP, Ramaekers FC: Distribution patterns of type VII collagen in normal and malignant human tissues. *Am.J Pathol.* 1991;139:451-459.
124. Woodley DT, Burgeson RE, Lunstrum G, Bruckner-Tuderman L, Reese MJ, Briggaman RA: Epidermolysis bullosa acquisita antigen is the globular carboxyl terminus of type VII procollagen. *J Clin.Invest* 1988;81:683-687.
125. Wright P: Untoward effects associated with practolol administration: oculomucocutaneous syndrome. *Br.Med.J* 1975;1:595-598.
126. YAMADA E: The fine structure of the renal glomerulus of the mouse. *J.Histochem.Cytochem.* 1955;3:309.
127. Yurchenco PD, Ruben GC: Basement membrane structure in situ: evidence for lateral associations in the type IV collagen network. *J Cell Biol.* 1987;105:2559-2568.
128. Zaltas MM, Ahmed R, Foster CS: Association of HLA-DR4 with ocular cicatricial pemphigoid. *Curr.Eye Res.* 1989;8:189-193.

129. Zillikens D, Wever S, Roth A, Weidenthaler-Barth B, Hashimoto T, Brocker EB: Incidence of autoimmune subepidermal blistering dermatoses in a region of central Germany. Arch.Dermatol. 1995;131:957-958.
130. Ziober BL, Lin CS, Kramer RH: Laminin-binding integrins in tumor progression and metastasis. Semin.Cancer Biol. 1996;7:119-128.

8. Anhang

8.1. Färbeprotokoll APAAP-Methode

- **Primärantikörper** auftragen (100 µl/Schnitt)
- 30 Minuten in der feuchten Kammer inkubieren
- Präparate 2 x 5 Minuten in Tris-Waschpuffer schaukeln
- Bei Ziege-/Kaninchen-Primärantikörper:
Maus-Anti-Ziege-/Maus-Anti-Kaninchen-AK (100 µl/Schnitt),
sonst weiter mit Link
- 30 Minuten in der feuchten Kammer inkubieren
- 2 x 5 Minuten in Tris-Puffer waschen
- **Link** (5–8 Tropfen/Schnitt)
- 30 Minuten in der feuchten Kammer inkubieren
- 2 x 5 Minuten in Tris-Puffer waschen
- **APAAP** (5–8 Tropfen/Schnitt)
- 30 Minuten in der feuchten Kammer inkubieren
- 2 x 5 Minuten in Tris-Puffer waschen
- **Substrat** (ca. 250 µl/Schnitt)
- 30 Minuten in der feuchten Kammer inkubieren
- 3 Minuten mit Waschpuffer, dann 3 Minuten mit Leitungswasser waschen
- mit **Hämalaun** 1–2 Minuten in der Küvette gegenfärben
- mit Leitungswasser wässern bis die Präparate vollständig von Farbe befreit sind

8.2. Reagenzien

8.2.1. Antikörper-Verdünnungsreagenzien

- Maus-Primärantikörper: Verdünnung mit 1%igem FCS
- Ziege-/Kaninchen-Primärantikörper: Verdünnung mit Antibody-Diluent (DakoCytomation, Hamburg, Deutschland)
- Maus-Anti-Ziege-/Maus-Anti-Kaninchen-Brückenantikörper: Verdünnung 1:1000 mit 1%igem FCS

- Sekundärantikörper: Gebrauchsfertig (Dako ChemMate™ Detection Kit APAAP, Mouse, USA)

8.2.2. APAAP

gebrauchsfertig (Dako ChemMate™ Detection Kit APAAP, Mouse, USA)

8.2.3. Farbstoff-Substrat

Reagenzien: Substrat-Puffer, Levamisole, Chromogen Red 1, Red2, Red3 (Dako ChemMate™ Detection Kit APAAP, Mouse, USA)

- Lösung nicht mehr als 20 Minuten vor Gebrauch ansetzen
- 1 Tropfen Levamisol pro 10 ml Substrat-Puffer
- pro Präparat: 250 µl Substrat-Puffer + 10 µl Red 1 + 10 µl Red 2 + 10 µl Red 3

8.2.4. 1%iges FCS

FCS (PD Dr. rer. nat. Wildner, München, Deutschland) mit Tris-Puffer im Verhältnis 1:100 verdünnen

8.2.5. Tris-Puffer

10fach-Konzentrat:

302,75 g 0,5 M Tris (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und

409,08 g 1,4 M NaCl (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

in ca. 4,5 Liter Aqua dest. lösen, pH mit HCl auf 7,6 einstellen, dann auf 5,0 Liter auffüllen

Gebrauchslösung:

Verdünnung 1:10 mit Aqua dest.

9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Dr. med. Anselm Kampik, Direktor der Augenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU), München, für die Möglichkeit, an der von ihm geleiteten Klinik wissenschaftlich tätig sein und diese Arbeit durchführen zu können;

Frau PD Dr. med. Elisabeth Meßmer, Oberärztin und Leiterin der histologischen Abteilung der LMU-Augenklinik, München, für die Themenstellung und die fortdauernde intensive Betreuung. Durch ihre wissenschaftliche Anleitung und ihre ständige Bereitschaft als Ansprechpartner einen hohen zeitlichen Einsatz aufzuwenden, hat sie ganz wesentlich zur Verwirklichung dieser Arbeit beigetragen;

Frau Anette Serbin und **Frau Andrea Pressler**, Medizinisch-technische Laboratoriumsassistentinnen (MTLA) der histologischen Abteilung der LMU-Augenklinik, München, sowie **Frau Puchta**, MTLA der histologischen Abteilung der dermatologischen Klinik der LMU, München, für die Einweisung in den praktischen Teil dieser Arbeit und die Hilfestellung bei technischen Problemen;

Frau PD Dr. rer. nat. Gerhild Wildner, Leiterin der Arbeitsgruppe Immunbiologie der LMU-Augenklinik, München, für die Bereitstellung von Reagenzien und die Beratung bei immunhistochemischen Fragestellungen;

Herrn Harald Kröhn, Computergrafiker der LMU-Augenklinik, München, für die Bildbearbeitung und die Posterdrucke;

Meinem Vater für liebevolle Unterstützung, Ermutigung und stete persönliche Förderung.

10. Lebenslauf

Angaben zur Person:

Name: Veronique Marguerite-Marie Valet
Geburtsdatum/-ort: 14.10.1977 in München
Nationalität: deutsch

Schulbildung:

09/1983 – 07/1987 Großhaderner Grundschule, München
09/1987 – 07/1994 Ludwigsgymnasium, München
09/1994 – 06/1996 Dante-Gymnasium, München
06/1996 allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung:

09/1996 – 07/1999 staatliche Berufsfachschule für MTLA am
Max von Pettenkofer-Institut der Universität München
08/1999 staatliche Prüfung

Hochschulbildung:

11/1999 – 08/2001 Ludwig-Maximilians-Universität, München
Studiengang: Humanmedizin, vorklinisches Studium
09/2001 Physikum
10/2001 – 03/2005 klinisches Studium, LMU München
08/2002 erstes Staatsexamen
03/2005 zweites Staatsexamen
04/2005 – 03/2006 praktisches Jahr, LMU München
05/2006 drittes Staatsexamen

Beruflicher Werdegang:

01.06.2006 Approbation
seit 08/2006 Assistenzärztin an der Augenklinik des Klinikums rechts der Isar der
TU-München (Prof. Dr. Dr. Chris P. Lohmann)

Auszeichnungen:

09/2004 Verleihung des 4. Posterpreises der 102. Tagung der DOG
für das Poster "Verteilung von Collagen IV, Laminin β 1, Laminin γ 1,
Kalinin und β 4-Integrin in normaler Haut, gesunder Bindehaut und
Bindehaut bei bekanntem Glaukom"